

Aus der Klinik für Dermatologie und Allergologie  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Michael Hertl

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

# **Photodynamische Therapie und Pathomechanismen des Lichen planus**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von:

Ronja Maria Stein aus Köln

Marburg, 2017

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 20.06.2017

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:	Herr Prof. Dr. H. Schäfer
Referent:	Herr Prof. Dr. M. Hertl
1. Korreferent:	Herr PD Dr. mult. T. Ziebart

# INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	III
TABELLENVERZEICHNIS .....	VI
ZUSAMMENFASSUNG .....	VII
ABSTRACT .....	IX
<b>1</b> <b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1      Lichen planus der Haut und Hautanhangsgebilde .....	1
1.2      Lichen planus der Schleimhäute.....	4
1.2.1    Oraler Lichen Planus.....	5
1.3      Histopathologie .....	7
1.4      Pathophysiologie .....	9
1.4.1    Antigenspezifische Steuerung der Immunantwort .....	10
1.4.2    Unspezifische Mechanismen.....	15
1.4.3    Humorale Mechanismen.....	17
1.5      Ätiologie .....	19
1.6      Diagnose.....	19
1.7      Differentialdiagnose .....	20
1.8      Behandlung.....	20
1.9      Photodynamische Therapie.....	21
<b>2</b> <b>FRAGESTELLUNG UND HYPOTHESEN .....</b>	<b>23</b>
2.1      Studienteil A: Pathomechanismen des Lichen planus.....	23
2.2      Studienteil B: Photodynamische Therapie des oralen Lichen planus .....	24
<b>3</b> <b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>25</b>
3.1      Material .....	25
3.1.1    Chemikalien und Reagenzien .....	25
3.1.2    Medien, Lösungen und Puffer .....	26
3.1.3    Kommerzielle Kits für die serologische und zelluläre Diagnostik.....	26
3.1.4    Antikörper .....	27
3.1.5    T-Zellkultur .....	27
3.1.6    Humane kutane Autoantigene .....	28
3.1.7    Verbrauchsmaterialien .....	28
3.1.8    Geräte.....	28

3.1.9	Software .....	29
3.2	Methoden.....	30
3.2.1	Photodynamische Therapie.....	30
3.2.2	Patienten .....	30
3.2.3	Probengewinnung und Aufbereitung.....	37
3.2.4	Durchflusszytometrie .....	39
3.2.5	Enzyme-linked Immunosorbent Assay .....	43
3.2.6	Enzyme-linked Immunospot Assay .....	44
3.2.7	Histopathologie .....	48
3.2.8	Statistische Analysen.....	49
4	ERGEBNISSE .....	50
4.1	Studienteil A: Pathomechanismen des Lichen planus.....	50
4.1.1	Bestimmung der plasmatischen Chemokin- und Zytokinlevel mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay .....	50
4.1.2	Charakterisierung peripherer T-Zellantworten mittels Enzyme-linked Immunospot Assay.....	56
4.2	Studienteil B: Photodynamische Therapie des oralen Lichen planus .....	62
4.2.1	Durchflusszytometrische Analyse peripherer T-Zellsubpopulationen.....	62
4.2.2	Bestimmung der Chemokin- und Zytokinlevel im Plasma und im Speichel mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay .....	69
4.2.3	Charakterisierung peripherer T-Zellantworten mittels Enzyme-linked Immunospot Assay.....	76
4.2.4	Immunhistopathologische Bestimmung der T-Zellsubpopulationen im läsionalen Entzündungsinfiltrat .....	82
4.2.5	Klinische Ergebnisse .....	86
5	DISKUSSION .....	88
5.1	Studienteil A: Pathomechanismen des Lichen planus.....	88
5.1.1	Chemokin- und Zytokinlevel im Plasma des peripheren Blutes .....	89
5.1.2	T-Zellantworten .....	91
5.2	Studienteil B: Photodynamische Therapie des oralen Lichen planus .....	94
5.2.1	Periphere T-Zellsubpopulationen.....	95
5.2.2	Chemokin- und Zytokinlevel im Plasma und Speichel.....	98
5.2.3	T-Zellantworten .....	99
5.2.4	T-Zellsubpopulationen läsionaler Mundschleimhautbiopsien.....	100
6	LITERATUR .....	102
7	VERZEICHNIS AKADEMISCHER LEHRER .....	110

8	DANKSAGUNG .....	111
---	------------------	-----

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACK-Lyse	Ammonium-Chlorid-Kalium-Lyse
ABSIS	Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score
APC	Allophycocyanin
AK	Antikörper
BP	bullöses Pemphigoid
CD	Cluster of Differentiation/Unterscheidungsgruppe
CPDA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dsc	Desmocollin
Dsg	Desmoglein
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ELISpot-Assay	Enzyme-linked Immunospot Assay
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting/Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FCS	Fetal Calf Serum/Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
Foxp3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Forward Scatter/Vorwärtsstreuung
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iTreg	induzierte regulatorische T-Zelle/n
K	gesunde Kontrollen
LSM	Lymphozytenseparationsmedium
LP	Lichen planus
LPP	Lichen planus pemphigoides
MHC	Major Histocompatibility Complex/Haupthistokompatibilitätskomplex
MMP	Matrixmetalloproteinase
nTreg	natürliche regulatorische T-Zelle/n
OD	optische Dichte
OLP	oraler Lichen planus
PBS	Phosphat Bufferd Saline/Phosphatgepufferte Salzlösung
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells/mononukleäre Zellen des peripheren Blutes

PDT	Photodynamische Therapie
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
PHA	Phytohämagglutinin
PHS	Pooled Human Serum/Humanes Serum
PS	Photosensibilisator/en
PV	Pemphigus vulgaris
rpm	revolutions per minute/Umdrehungen pro Minute
SSC	Side Scatter/Seitwärtsstreuung
Tc	zytotoxische T-Zelle/n
TCR	T-Zellrezeptor/en
TGF	Transforming Growth Factor/Transformierender Wachstumsfaktor
TH	T-Helferzelle/n
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases/Inhibitor der Matrixmetalloproteinasen
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle/n

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1	Klassische Effloreszenzen des Lichen planus der Haut -----	2
Abbildung 1.2	Klinische Erscheinungsformen des oralen Lichen planus -----	6
Abbildung 1.3	Histologischer Schnitt einer OLP-Läsion-----	9
Abbildung 1.4	Übersicht über die verschiedenen T-Zellsubpopulationen, ihre Zytokine und ihre Hauptfunktion -----	12
Abbildung 1.5	Schematische Darstellung der desmosomalen und hemidesmosomalen Haftkontakte im Bereich der dermo-epidermalen Junktionszone -----	19
Abbildung 3.1	Zeitlicher Ablauf der klinischen Vorgehensweise bei der PDT des OLP -----	30
Abbildung 3.2	Beispiel für die computergestützten Auswertung der durchflusszytometrischen Proben (Cocktail C2) -----	42
Abbildung 3.3	Gatingschritte für die einzelnen Antikörper-Cocktails in der computergestützten Auswertung der durchflusszytometrischen Daten -----	43
Abbildung 3.4	Analyse der Spotzahlen im Enzyme-linked Immunospot Assay -----	48
Abbildung 3.5	Beispiel für das Vorgehen bei der Quantifizierung immunhistologisch markierter Zellen im Entzündungsinfiltrat von OLP-Patienten (CD4-Färbung)-----	49
Abbildung 4.1	CXCL10-Konzentrationen im Plasma -----	50
Abbildung 4.2	CCL5-Konzentration im Plasma-----	51
Abbildung 4.3	IL-8-Konzentration im Plasma -----	52
Abbildung 4.4	IFN $\gamma$ -Konzentration im Plasma -----	52
Abbildung 4.5	IL-5-Konzentration im Plasma -----	53
Abbildung 4.6	IL-17a-Konzentration im Plasma -----	54
Abbildung 4.7	Mittelwerte und Standardabweichung der ELISAs -----	55
Abbildung 4.8	Anzahl der IFN $\gamma$ -, IL-5- und IL-17a-sezernierenden T-Lymphozyten nach Stimulation mit Dsg1-----	56
Abbildung 4.9	Anzahl der IFN $\gamma$ -, IL-5- und IL-17a-sezernierenden T-Lymphozyten nach Stimulation mit Dsg3-----	57
Abbildung 4.10	Anzahl der IFN $\gamma$ -, IL-5- und IL-17a-sezernierenden T-Lymphozyten nach Stimulation mit BP180-NH $_2$ -----	58
Abbildung 4.11	Anzahl der IFN $\gamma$ -, IL-5- und IL-17a-sezernierenden T-Lymphozyten nach Stimulation mit BP180-COOH-----	59
Abbildung 4.12	Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN $\gamma$ -, IL-5 und IL-17a-ELISpot- Assays-----	60



Abbildung 4.13	Prozentualer Anteil der $CD25^+CD127^{low}$ -Zellen an der $CD4^+$ -T-Zellsubpopulation in peripheren Blut-----	62
Abbildung 4.14	Prozentualer Anteil der $CD8^+$ -T-Lymphozyten innerhalb der T-Lymphozytenpopulation des peripheren Blutes -----	63
Abbildung 4.15	Prozentualer Anteil der $CD4^+$ -T-Lymphozyten innerhalb der T-Lymphozytenpopulation des peripheren Blutes -----	63
Abbildung 4.16	Prozentualer Anteil der $\alpha/\beta$ -TCR <sup>+</sup> Lymphozyten innerhalb der Lymphozytenpopulation des peripheren Blutes -----	64
Abbildung 4.17	Prozentualer Anteil der $\gamma/\delta$ -TCR <sup>+</sup> Lymphozyten innerhalb der Lymphozytenpopulation des peripheren Blutes -----	64
Abbildung 4.18	Prozentualer Anteil der CCR4 <sup>+</sup> -Zellen an den $CD3^+CD8^+$ -T-Zellen des peripheren Blutes-----	65
Abbildung 4.19	Prozentualer Anteil der $CD137^+$ -Zellen an den $CD3^+CD8^+$ -Zellen des peripheren Blutes-----	67
Abbildung 4.20	Prozentualer Anteil der $CD137^+$ -Zellen an den $CD3^+CD4^+$ -Zellen des peripheren Blutes-----	67
Abbildung 4.21	Mittelwerte und Standardabweichungen der durchflusszytometrischen Analyse der T-Zellsubpopulationen des peripheren Blutes -----	68
Abbildung 4.22	CXCL10-Konzentrationen im Plasma-----	69
Abbildung 4.23	CXCL10-Konzentrationen im Speichel -----	69
Abbildung 4.24	CCL5-Konzentrationen im Plasma -----	70
Abbildung 4.25	CCL5-Konzentrationen im Speichel-----	70
Abbildung 4.26	IL-8-Konzentrationen im Plasma -----	71
Abbildung 4.27	IL-8-Konzentrationen im Speichel -----	71
Abbildung 4.28	IFN $\gamma$ -Konzentrationen im Plasma -----	72
Abbildung 4.29	IFN $\gamma$ -Konzentrationen im Speichel -----	72
Abbildung 4.30	IL-5-Konzentrationen im Plasma -----	73
Abbildung 4.31	IL-5-Konzentrationen im Speichel -----	73
Abbildung 4.32	IL-17a-Konzentrationen im Plasma-----	74
Abbildung 4.33	IL-17a-Konzentrationen im Speichel -----	74
Abbildung 4.34	Mittelwerte und Standardabweichungen der ELISAs unter Verwendung von Plasmaproben -----	75
Abbildung 4.35	Mittelwerte und Standardabweichungen der ELISAs unter Verwendung von Speichelproben-----	75

Abbildung 4.36	Anzahl der IFN $\gamma$ -, IL-5- und IL-17a-sezernierenden T-Lymphozyten nach Stimulation mit PHA-----	77
Abbildung 4.37	Anzahl der IFN $\gamma$ -, IL-5- und IL-17a-sezernierenden T-Lymphozyten nach Stimulation mit Dsg3-----	78
Abbildung 4.38	Anzahl der IFN $\gamma$ -, IL-5- und IL-17a-sezernierenden T-Lymphozyten nach Stimulation mit BP180-NH <sub>2</sub> -----	79
Abbildung 4.39	Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN $\gamma$ -, IL-5- und IL-17a-ELISpot-Assays-----	80
Abbildung 4.40	Gesamtzahl der Zellen im dermalen Entzündungsinfiltrat in der CD4-Färbung -----	82
Abbildung 4.41	Anzahl der CD4 <sup>+</sup> -Zellen im dermalen Entzündungsinfiltrat-----	82
Abbildung 4.42	prozentualer Anteil der CD4 <sup>+</sup> -Zellen am Gesamtinfiltrat -----	83
Abbildung 4.43	Gesamtzahl der Zellen im dermalen Entzündungsinfiltrat in der CD8-Färbung -----	83
Abbildung 4.44	Anzahl der CD8 <sup>+</sup> -Zellen im dermalen Entzündungsinfiltrat-----	84
Abbildung 4.45	prozentualer Anteil der CD8 <sup>+</sup> -Zellen am Gesamtinfiltrat -----	84
Abbildung 4.46	Mittelwerte und Standardabweichungen der immunhistologischen Analyse der T-Zellsubpopulationen -----	85
Abbildung 4.47	Ergebnisse der klinischen Vermessung der Läsionsgröße vor und zwei Wochen nach der letzten PDT-Anwendung-----	87

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 3.1	LP-Patientengruppe: Übersicht über die individuellen Patientendaten, die Verteilung der Haut- bzw. Schleimhautläsionen und die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche.....	32
Tabelle 3.2	Kontrollgruppe: Übersicht über die individuellen Patientendaten sowie die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche.....	34
Tabelle 3.3	BP-Vergleichsgruppe: Übersicht über die individuellen Patientendaten sowie die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche.....	35
Tabelle 3.4	OLP-Patientengruppe: Übersicht über die individuellen Patientendaten sowie die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche.....	37
Tabelle 3.5	Zusammensetzung der bei der Durchflusszytometrie verwendeten Antikörpercocktails.....	41
Tabelle 3.6	Standardbereiche und Probenverdünnungen im ELISA.....	44
Tabelle 3.7	Übersicht über die finale Stimulation der PBMC im ELISpot-Assay .....	47
Tabelle 4.1	Ergebnisse des ELISAs: p-Werte des Vergleichs der untersuchten Patientengruppen.....	55
Tabelle 4.2	Ergebnisse des ELISpot-Assays: p-Werte des Vergleichs der untersuchten Patientengruppen.....	61
Tabelle 4.3	Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der T-Zellsubpopulationen des peripheren Blutes: p-Werte des Vergleichs der prä- und posttherapeutischen Werte .....	68
Tabelle 4.4	p-Werte des Vergleichs der prä- und posttherapeutischen Chemokin- und Zytokinlevel im Plasma und im Speichel .....	75
Tabelle 4.5	Ergebnisse des ELISpot-Assays: p-Werte des prä- und posttherapeutischen Vergleichs der Sekretion stimulierter T-Zellen.....	81
Tabelle 4.6	p-Werte des prä- und posttherapeutischen Vergleichs der T-Zellsubpopulationen im dermalen Entzündungsinfiltrat.....	85

## ZUSAMMENFASSUNG

Der Lichen planus (LP) stellt eine häufige chronische, inflammatorische Autoimmundermatose dar. Betroffen sind Haut und/oder Schleimhäute, wobei der orale Lichen planus (OLP) eine besonders häufige Form darstellt. Bisher stehen lediglich symptomatische Therapien zur Verfügung, die oftmals mit einer Vielzahl von Nebenwirkungen verbunden sind. Neue nebenwirkungsarme Therapiemöglichkeiten, wie die Photodynamische Therapie (PDT), stellen hier möglicherweise eine sinnvolle Therapiealternative dar. Die Ätiopathogenese des LP und die Existenz eines (Auto-)Antigens konnten bis heute nicht vollständig geklärt werden, jedoch bildet eine T-Zell-medierte Autoimmunpathogenese den Konsens der Forschung. Dabei konnte gezeigt werden, dass autoreaktive CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen über eine Induktion der Apoptose basaler Keratinozyten zu einer Desintegration des Epithels führen und so das typische Krankheitsbild hervorrufen. Die Rolle anderer T-Zellen bleibt bisher weitgehend unbeschrieben, jedoch deutet vieles auf eine Beteiligung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einer TH1-Dominanz hin. Die vorliegende Arbeit umfasst sowohl die Aufklärung von allgemeinen Pathomechanismen des LP als auch die Untersuchung des Einflusses der PDT auf immunologische Parameter und wurde daher in einen Studienteil A und B gegliedert.

Im **Studienteil A** soll über den Nachweis antigenspezifischer T-Zellen im peripheren Blut von LP-Patienten zu einer Identifizierung eines möglichen LP-Antigens beigetragen werden. Zudem soll die Rolle der verschiedenen T-Zellsubpopulationen in der Pathogenese des LP genauer eruiert werden.

Mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) wurden die peripheren Chemokin- und Zytokinlevel im Plasma bestimmt. Hier konnten im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöhte Level des inflammatorisch wirkenden, TH1-assoziierten Zytokins CCL5 festgestellt werden. Dieses Ergebnis unterstreicht die TH1-Tendenz beim LP und lässt annehmen, dass CCL5 einen wichtigen Faktor in der Pathogenese des LP darstellt.

Für den Nachweis antigenspezifischer T-Zellen wurden mittels Enzyme-linked Immunospot Assay (ELISpot-Assay) aus CPDA-Blut isolierte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes mit Desmoglein1 (Dsg1), Desmoglein3 (Dsg3) und Bullösem Pemphigoidantigen 180 (BP180) stimuliert und auf die Sekretion von Interferon gamma (IFN $\gamma$ ), Interleukin-5 (IL-5) und Interleukin-17a (IL-17a) hin untersucht. Dabei ließ sich für die Stimulation mit BP180-NH<sub>2</sub> eine signifikant erhöhte Anzahl IFN $\gamma$ -sezernierender T-Zellen feststellen, was stark auf ein Vorhandensein BP180-NH<sub>2</sub>-spezifischer T-Zellen beim LP hindeutet und die TH1-Tendenz beim LP erneut bestätigt. BP180-NH<sub>2</sub> stellt somit ein potentiell Autoantigen des LP dar, das über eine Aktivierung

antigenspezifischer T-Zellen zu einer vermehrten Freisetzung entzündungsfördernder Mediatoren wie CCL5 und IFN $\gamma$  führen könnte.

Im **Studienteil B** soll die immunologische Wirkung der PDT beim OLP untersucht werden. Dabei wurde mithilfe prä- und posttherapeutisch gewonnener peripherer Blutproben und läsionaler Mundschleimhautbiopsien der Effekt der PDT auf verschiedene T-Zellsubpopulationen analysiert und überprüft, ob die PDT zu einem messbaren Rückgang der Entzündungsparameter führen kann.

Anhand der klinischen Ergebnisse, die einen Rückgang der Läsionsgröße nach PDT zeigten, wurde die PDT als erfolgreich bewertet und die spezifischen immunologischen Veränderungen als Annäherung an physiologische Werte interpretiert.

Bei der durchflusszytometrischen Analyse peripherer T-Zellsubpopulationen zeigte sich der Anteil  $\gamma/\delta$ -TCR $^{+}$ -Lymphozyten an der Lymphozytenpopulation posttherapeutisch signifikant erhöht, was einen spezifischen Effekt der PDT auf diese T-Zellsubpopulation vermuten lässt.

Die Analyse peripherer Chemokin- und Zytokinlevel mittels ELISA wurde im Studienteil B für Plasma und Speichel durchgeführt. Dabei ließen sich posttherapeutisch signifikant verminderte Plasmalevel des auf aktivierte T-Zellen chemotaktisch wirkenden Chemokins CXCL10 feststellen. Diese Reduktion scheint dabei mit einer gleichzeitigen Abnahme der T-Zellen im Läsionsgewebe einherzugehen, was CXCL10 als einen für die T-Zellmigration in der Pathogenese des (O)LP entscheidenden Faktor definieren würde. Für die Chemokin- und Zytokinlevel im Speichel konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden.

Im ELISpot-Assay erfolgte die Zellstimulation bei Studienteil B mit Phytohämagglutinin, sowie mit Dsg3 und BP180-NH $_2$ . Dabei ließen sich posttherapeutisch keine signifikanten Veränderungen feststellen.

Ein spezifischer Effekt der PDT zeigte sich auch in der immunhistologischen Analyse des läsionalen Entzündungsinfiltrates. Dabei kam es posttherapeutisch zu einer signifikanten Reduktion des Anteils CD4 $^{+}$  Zellen am Gesamtinfiltrat, was die Beteiligung dieser T-Zellpopulation am Pathomechanismus unterstreicht. Aufgrund relativ konstanter Gesamtzellzahlen des Infiltrats nach PDT bleibt dieses noch genauer zu untersuchen.

Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, dass die PDT beim OLP einen spezifischen immunmodulatorischen Effekt auf periphere und läsionale T-Zellen hat und zu einem Rückgang spezifischer Entzündungsparameter führen kann.

## ABSTRACT

Lichen planus (LP) is a common chronic inflammatory autoimmune dermatosis, which affects the skin and/or the mucous membranes. Thereby oral Lichen planus (OLP) is a particularly common form. So far treatment has been limited to symptomatic therapies, which have been associated with a variety of side effects. New treatments with fewer side effects, such as the photodynamic therapy (PDT), might offer promising alternatives. Latest research proposes a T cell-mediated autoimmune pathogenesis, yet neither the aetiopathogenesis of LP nor the existence of an (auto-)antigen have been fully discovered. Autoreactive CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells have been demonstrated to induce apoptosis of basal keratinocytes and thereby causing a disintegration of the epithelium, consequently leading to the characteristic clinical picture. The impact of other T cells is largely unknown, however there are strong indications for the involvement of CD4<sup>+</sup> T cells with a TH1 dominance. This work studies both the general pathological mechanisms in LP, as well as the effects of PDT on immunological parameters and is therefore organized into two parts (A and B).

**Part A** aims to contribute to the identification of a possible LP antigen through an analysis of antigen-specific T cells in peripheral blood of LP patients. Furthermore it should contribute to a more profound understanding of the role of different T cell subpopulations in the pathogenesis of LP.

By the use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), chemokine and cytokine plasma levels were analyzed. Compared to healthy control plasma levels of the inflammatory TH1-cytokine CCL5 were significantly elevated, confirming the assumed TH1 bias and suggesting that CCL5 may play an important role in the pathogenesis of LP.

For the detection of antigen-specific T cells via enzyme-linked immunospot assay (ELISpot assay), peripheral blood mononuclear cells, which were isolated from CPDA blood, were stimulated by desmoglein 1 (Dsg1), desmoglein 3 (Dsg3) and bullous pemphigoid antigen 180 (BP180) and analyzed for the secretion of interferon gamma (IFN $\gamma$ ), interleukin-5 (IL-5) and interleukin-17a (IL-17a). Stimulation with BP180-NH<sub>2</sub> showed significantly increased numbers of IFN $\gamma$ -secreting T cells, which strongly indicates the presence of BP180-NH<sub>2</sub>-specific T cells in LP and further confirms the TH1 bias. Therefore BP180-NH<sub>2</sub> constitutes a potential autoantigen of LP, which might lead to an increased secretion of inflammatory mediators, such as CCL5 and IFN $\gamma$ .

**Part B** focuses on the immunological effects of PDT in OLP. Here, pre- and post-therapeutically obtained peripheral blood samples and oral mucosal biopsies were used to analyze the effects

of PDT on different T cell subpopulations. Furthermore, it was examined whether PDT led to a measurable decrease of inflammatory parameters.

Based on the clinical results, which showed a decrease in size of the lesions, PDT was rated as a success and specific immunological changes were interpreted as an approach to physiological values.

The analysis of different T cell subsets in peripheral blood via flow cytometry showed significantly elevated percentages of  $\gamma/\delta$ -TCR<sup>+</sup>-lymphocytes in the lymphocyte subpopulation after PDT. The post-therapeutic increase indicates that PDT has a specific effect on this T cell subset.

In part B, the analysis of peripheral chemokine- and cytokine levels by ELISA was performed for plasma and for saliva. Here, plasmatic levels of the chemokine CXCL10, which presents a chemotactic stimulus for activated T cells, were decreased significantly after therapy. This reduction seems to be associated with a concomitant decrease of T cells in the lesional tissue, which could reveal CXCL10 as an important factor for T cell migration in the pathogenesis of (O)LP. No significant post-therapeutic changes were observed regarding the chemokine- and cytokine levels in saliva.

By ELISpot assay, peripheral T cells were stimulated by phytohaemagglutinin (PHA), Dsg3 and BP180-NH<sub>2</sub>, but no significant posttherapeutic change was noticed in this experimental approach.

The specific immunological effects of PDT also became apparent in the immunohistologic analysis of the lesional inflammatory infiltrate. Here, a significant post-therapeutic decrease of CD4<sup>+</sup> cells in the entire infiltrate was detected, indicating the involvement of this T cell subset in the pathogenesis. Nonetheless, due to the relatively constant total cell numbers of the infiltrate after PDT, it requires further examination.

In summary, it has been shown here, that PDT has a specific immunomodulatory effect on peripheral and lesional T cells in OLP and can reduce particular inflammatory parameters.

# **1 EINLEITUNG**

Lichen planus (LP), im deutschsprachigen Raum auch bekannt als Lichen ruber planus oder Knötchenflechte, ist eine chronische, inflammatorische Autoimmunerkrankung der Haut und/oder Schleimhäute sowie der Hautanhangsgebilde, die 1869 erstmals von Wilson beschrieben wurde (Ismail et al. 2007). Sie betrifft vor allem Patienten mittleren Alters mit einer ausgeglichenen Geschlechterbilanz. Die genaue Prävalenz ist unbekannt, wird aber auf 0,5-1% der Weltbevölkerung geschätzt (Wagner et al. 2013). LP mit Manifestation an Haut, Kopfhaut und Nägeln wird auch als kutaner LP bezeichnet, während sich der Lichen planus mucosae im Bereich der Schleimhäute des oberen Gastrointestinaltraktes, der Genitalien, des Larynx und an der Konjunktiva manifestieren kann. Die verschiedenen Formen können isoliert aber auch kombiniert auftreten (Boyd und Neldner 1991). Die Häufigkeit einer Schleimhautbeteiligung liegt bei 30-70% (Wagner et al. 2013).

Weder die Ätiologie noch die Pathogenese dieser, zum Teil mit schwerer Symptomatik belasteten Erkrankung, konnten bisher ausreichend geklärt werden. Zudem steht bis heute keine kurative Therapie des LP zur Verfügung. Der aktuelle Stand der Forschung bezüglich des klinischen Erscheinungsbildes der Erkrankung, der Ätiopathogenese und der Therapie soll daher auf den folgenden Seiten dargestellt werden.

## **1.1 Lichen planus der Haut und Hautanhangsgebilde**

Das klinische Bild des LP zeichnet sich durch charakteristische Effloreszenzen insbesondere an den Beugeseiten von Handgelenken, Unterarmen und Beinen aus. Diese präsentieren sich klassisch als juckende, rote, polygonale, plateauartig-erhabene, glatte, glänzende Papeln oder Plaques. Im englischen Sprachraum werden diese Merkmale des LP oft unter dem Begriff „six p’s“ (planar, purple, polygonal, pruritic, papules, plaques) zusammengefasst (Usatine und Tinitigan 2011). Sie treten meist bilateral und symmetrisch auf. Die Läsionsoberfläche wird häufig von typischen weißlichen, punkt- oder netzförmigen Belägen bedeckt, die nach ihren Erstbeschreibern Weyl (1885) und Wickham (1895) als „Weyl-Wickham’sche Streifen“ oder „Wickham’sche Zeichnung/Streifen“ bezeichnet werden. Neben diesen spezifischen Merkmalen kann beim LP noch ein weiteres klinisches Phänomen auftreten, das als isomorpher Reizeffekt oder Köbner-Phänomen bekannt ist. Dabei lassen sich die Effloreszenzen auf zuvor asymptomatischer Haut durch einen unspezifischen Reiz (mechanisch, chemisch, thermisch) auslösen.





**Abbildung 1.1 Klassische Effloreszenzen des Lichen planus der Haut**

*Die Abbildung zeigt die typischen rötlichen, polygonalen, plateauartig-erhabenen Papeln des klassischen kutanen LP. In der Vergrößerung wird zudem die weißliche Wickham'sche Zeichnung im Läsionsbereich erkennbar.*

*Quelle: Klinik für Dermatologie und Allergologie des Universitätsklinikums Marburg*

Der Ausbruch der Erkrankung erfolgt gewöhnlich akut, Remissionen sind allerdings häufig (Usatine und Tinitigan 2011). So konnten Irvine et al. in einer Langzeitstudie mit 214 Patienten zeigen, dass es bei 68% der Patienten innerhalb des ersten Jahres nach Krankheitsausbruch zu einem Rückgang der Läsionen kam. Nach Remission bleiben jedoch häufig persistierende Verfärbungen der Haut zurück oder es kommt zu Rezidiven, wobei Irvine et al. eine Rezidivrate von 49% ermittelten (Irvine et al. 1991).

Anhand der Morphologie und der Konfiguration der Effloreszenzen lässt sich der kutane LP klinisch in verschiedene Subtypen unterteilen. Viele dieser Formen treten im Bereich der Felderhaut des Integuments auf. Daneben kann sich der kutane LP aber auch an Handflächen und Fußsohlen (Lichen planus palmoplantaris), der Kopfhaut (Lichen planus planopilaris), sowie den Nägel lokalisieren (Gorouhi et al. 2014).

▪ **Einteilung des kutanen Lichen planus anhand klinischer Morphologie und Konfiguration:**

• **Lichen planus actinicus**

Seltene Variante des LP mit Papeln oder Plaques in anulärer oder nummulärer Anordnung, insbesondere an lichtexponierten Hautarealen. Die Läsionen zeigen typischerweise einen hypopigmentierten Hof und ein hyperpigmentiertes Zentrum (Gorouhi et al. 2014).

- **Lichen planus anularis**  
Seltene, häufig nicht juckende Form des LP, die vor allem Penis, Axilla, Leiste, aber auch die Extremitäten betreffen kann (Gorouhi et al. 2014; Reich et al. 2004).
- **Lichen planus atrophicans**  
Seltene Form des LP mit gut demarkierten weißen, pinkfarbenen oder bläulichen Papeln bzw. Plaques. Dabei kommt es zu oberflächlichen Atrophien der Haut (Usatine und Tinitigan 2011).
- **Lichen planus hyperthrophicus**  
Diese oft chronische, stark juckende Form des LP, die auch als Lichen planus verrucosus bekannt ist, findet sich meist an den Extremitäten, insbesondere an Knöcheln, Schienbeinen und an den Interphalangealgelenken (Usatine und Tinitigan 2011; James et al. 2006). Die Läsionen erscheinen rot-braun bis violett-grau (Gorouhi et al. 2014).
- **Lichen planus bullosus**  
Form des LP mit Ausbildung straffer, mit klarer bis gelblicher Flüssigkeit gefüllter Blasen im Bereich typischer LP-Läsionen (Wagner et al. 2013).
- **Lichen planus pemphigoides**  
Lichen planus pemphigoides (LPP) ist eine seltene Hauterkrankung, bei der es bei Patienten mit vorliegender LP-Erkrankung zur subepidermalen Blasenbildung kommt. Diese Blasen können sowohl auf gesunder und/oder erythematös veränderter Haut als auch innerhalb aktiver LP-Läsionen entstehen. Damit unterscheidet sich der LPP vom Lichen planus bullosus, wo die Blasenbildung allein im Bereich vorhandener LP-Läsion stattfindet. Der LPP weist weiterhin klinisch, histo- und immunpathologisch eine große Ähnlichkeit zu einer anderen blasenbildenden Hauterkrankung, dem Bullösen Pemphigoid (BP) auf (Willstead et al. 1991). So lassen sich etwa sowohl beim LPP als auch beim BP spezifische Autoantikörper gegen das Bullöse Pemphigoid Antigen 180 (BP180), einem Basalmembranbestandteil, nachweisen (Zillikens 2002; Zillikens et al. 1999; Zillikens 2002).
- **Lichen planus pigmentosus**  
Seltene, chronische Variante des LP, bei der es zur Ausbildung pigmentierter Papeln mit linearem, perifollikulärem, fleckenartigem oder zosteriformem Verteilungsmuster kommt (Zhang und Zhu 2011). Eine Ausbreitung entlang von Blaschko-Linien ist ebenfalls möglich (Wagner et al. 2013). Betroffen sind obere Extremität, Stamm, Gesicht und Schleimhäute (Zhang und Zhu 2011).

- **Erythrodermischer Lichen planus**

Sehr seltene, stark juckende Form des LP mit roten oder violetten Papeln und erythematösen Plaques. Zusätzlich kann es zu einer Schuppung kommen (Wagner et al. 2013).

- **Lichen planus follicularis**

Diese Form des LP tritt in drei verschiedenen Varianten auf. Als klassischer Lichen planopilaris, als frontal fibrosierende Alopezie oder als Lassueur-Graham-Little-Syndrom (Assouly und Reygagne 2009). Betroffen ist vor allem die Kopfhaut, wobei es zu Atrophien, Haarverlust und Narbenbildung kommen kann (Chieregato et al. 2003).

- **Lichen planus inversus**

Diese sehr seltene Form des LP zeichnet sich durch große, erythematöse Läsionen mit unscharfer Randbegrenzung aus (Wagner et al. 2013). Die asymptomatischen bis leicht juckenden, hyperpigmentierten Maculae treten besonders in intertriginösen Hautbereichen, Hautfalten und an Beugeseiten auf (Gaertner und Elstein 2012).

- **Lichen ruber linearis**

Seltene Form des LP, mit linearer Läsionsanordnung in Form von Papeln. Dabei erscheinen diese entlang von Blaschko-Linien, segmental, zosteriform oder in Form nur wenige Zentimeter langer Streifen (Wagner et al. 2013).

## **1.2 Lichen planus der Schleimhäute**

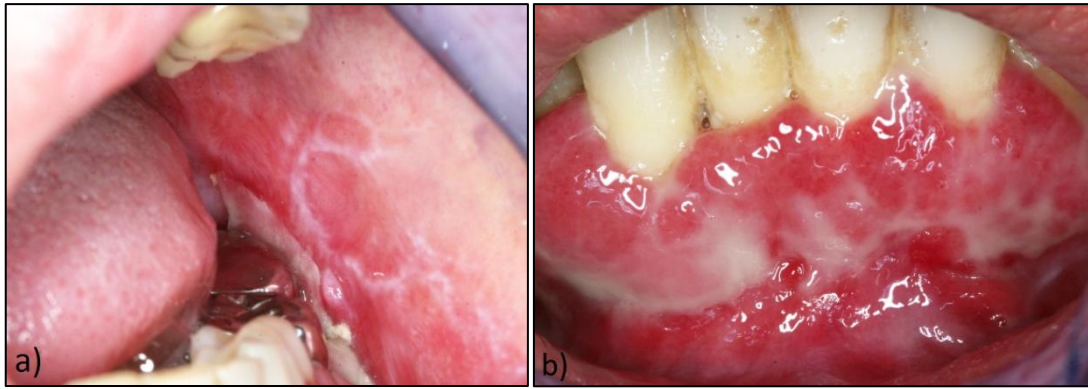
Die Schleimhäute bilden eine wichtige Lokalisation im Rahmen der Manifestation des LP. Besonders häufig betroffen sind die Schleimhäute des Mundes. Die verschiedenen Läsionsformen in diesem Bereich werden unter dem Begriff oraler Lichen planus (OLP) zusammengefasst. Weiterhin kann sich der Lichen planus mucosae an den Genitalien manifestieren. Vulvovaginale Läsionen ähneln häufig denen des OLP, können isoliert oder in Zusammenhang mit OLP auftreten (vulvovaginales gingivales Syndrom) und zu starken Beeinträchtigungen der Lebensqualität der Betroffenen führen. Eher selten sind dagegen Manifestationen im Bereich des Ösophagus, des Larynx oder der Schleimhäute des Auges. Zumeist treten letztere LP-Varianten in Assoziation mit anderen Formen des LP auf (Fox et al. 2011; Gorouhi et al. 2014; Rozas Muñoz et al. 2011). Auf den OLP, als häufigste Schleimhautvariante des LP, soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

### **1.2.1 Oraler Lichen Planus**

Prinzipiell kann der OLP in jedem Alter auftreten. Die Erkrankung tritt jedoch besonders bei Patienten über 40 auf (Vincent et al. 1990). Frauen sind etwas häufiger betroffen. Dabei beträgt die Ratio zwischen Frauen und Männern etwa 1,4:1 (Axéll und Rundquist 1987).

Genaue Inzidenz und Prävalenz des OLP sind unbekannt. Jedoch konnten etwa Axéll und Rundquist 1987 in einer großangelegten Studie mit über 20.000 Personen eine Prävalenz von 1,9% in Schweden ermitteln (Axéll und Rundquist 1987). Weitere Studien in Japan (0,5%) (Ikeda et al. 1991), Indien (2,6%) (Murti et al. 1986) und Malaysia (0,38%) (Zain et al. 1997) lassen eine weltweite Prävalenz von etwa 0,5-2% annehmen (McCreary und McCartan 1999). Die orale Form des LP tritt somit bedeutend häufiger auf als die kutane, wobei jedoch zwischen 30 und 50% der OLP-Patienten auch kutane Läsionen aufweisen (Edwards und Kelsch 2002).

Das klinische Bild wird durch unterschiedliche Läsionen charakterisiert, die meist symmetrisch und bilateral, aber auch multipel auftreten können. Dazu zählen die charakteristischen Wickham'schen Streifen, weiße Plaques, Papeln, Erytheme, Erosionen oder Blasen. Betroffen sind vor allem die bukkale Mukosa, der Zungenrücken und die Gingiva (Ismail et al. 2007; Andreasen 1968). Die Läsionen persistieren oft über viele Jahre und durchlaufen Phasen der Exazerbation mit Verschlechterung der individuellen Symptomatik und Remission (Ismail et al. 2007). Anhand der Läsionen ergibt sich eine klinische Einteilung in sechs Formen: retikulär, plaqueartig, papulös, erosiv, atrophisch und bullös (Ismail et al. 2007; Andreasen 1968). Dabei äußern sich die ersten drei Formen durch ein weißliches Erscheinungsbild und die drei letzteren durch ein rotes. Nicht selten finden sich bei einem Patienten verschiedene Formen nebeneinander (Edwards und Kelsch 2002), wobei insbesondere die roten Formen (erosiv, atrophisch, bullös) zu schwerer Symptomatik und einer starken Einschränkung der Lebensqualität der Patienten führen können. Der oralen Form des LP wird zudem ein gewisses malignes Potential, also ein erhöhtes Risiko zur Ausbildung von Plattenepithelkarzinomen auf Basis der Läsionen, zugeschrieben, wobei dies wissenschaftlich noch nicht eindeutig bewiesen werden konnte und immer noch kontrovers diskutiert wird (Lodi et al. 2005a; Lodi et al. 2005b).



**Abbildung 1.2 Klinische Erscheinungsformen des oralen Lichen planus**

*Die Abbildung zeigt verschiedene Läsionsformen des OLP, die simultan bei einer Patientin vorliegen. Bukkal findet sich die häufige retikuläre Form mit der typischen Wickham'schen Streifung (a), während im Vestibulum erosive Läsionen, die zum Teil mit einer Pseudomembran bedeckt sind, erkennbar werden (b).*

*Quelle: Klinik für Dermatologie und Allergologie des Universitätsklinikums Marburg*

## ▪ Formen des oralen Lichen planus

### • Retikulärer OLP

Die retikuläre Form ist die häufigste der sechs Subtypen des OLP. Ingafou et al. konnten in einer retrospektiven Studie mit 690 britischen OLP-Patienten nachweisen, dass 94,3% innerhalb dieser Patientengruppe an der retikulären Form des OLP leiden (Ingafou et al. 2006). Sie lässt sich anhand der typischen Wickham'schen Streifen, weißer keratotischer Streifen mit erythematösem Randsaum identifizieren. Diese treten typischerweise bilateral an der bukkalen Mukosa, der Umschlagfalte oder Gingiva auf. Seltener ist eine Manifestation an Lippen, Gaumen oder Zunge (Edwards und Kelsch 2002). Der retikuläre OLP ist meist asymptomatisch (Gupta und Jawanda 2015).

### • Papulöser OLP

Diese seltene Form des OLP tritt meist im Zusammenhang mit anderen Läsionsformen auf. Dabei bilden sich kleine, etwa 0,5-1 mm große, weiße Papeln, die peripher zusätzlich von einer feinen weißen Streifung umgeben sein können (Ismail et al. 2007).

### • Plaqueartiger OLP

Diese Form des OLP tritt mit multifokalen weißen, weichen, flachen oder erhabenen Läsionen, die an eine Leukoplakie erinnern, auf. Der plaqueartige OLP verhält sich meist asymptomatisch und findet sich vor allem im Bereich des Zungenrückens und der bukkalen Mukosa (Edwards und Kelsch 2002). Besonders häufig findet sich diese Form bei Rauchern (Thorn et al. 1988).

- **Erosiver OLP**

Der erosive OLP bildet die zweithäufigste Form des OLP und geht einher mit irregulären Erosionen oder Ulzerationen, die mit fibrinöser Plaque oder einer Pseudemembran bedeckt sein können (Edwards und Kelsch 2002). Die eigentlichen Läsionen werden peripher häufig von feinen keratotischen Streifen umgeben (Ismail et al. 2007). Läsionen dieser Form des OLP können mit der Zeit migrieren oder multifokal werden. Die Patienten leiden häufig unter Schmerzen und Brennen (Eisen 2002). Die Intensität dieser Symptome ist variabel. Sie treten beispielsweise verstärkt im Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme, insbesondere stark gewürzter Speisen auf (Ismail et al. 2007). Anhand der starken Schmerzen kann es außerdem zu Einschränkung und Vermeidungsverhalten in der Mundhygiene kommen, wodurch der Krankheitsverlauf negativ beeinflusst werden kann.

- **Atrophischer OLP**

Die Läsionen dieser Form des OLP präsentieren sich als diffuse, erythematöse Flecken, die von einer feinen, weißen Streifung umgeben sein können. Ebenso wie der erosive OLP, kann diese Form zu einer deutlichen Beschwerdesymptomatik führen (Edwards und Kelsch 2002).

- **Bullöser OLP**

Die bullöse Form des OLP stellt die seltenste Form des OLP dar. Sie äußert sich durch wenige Millimeter bis einige Zentimeter große Blasen, die nach kurzer Zeit zerreißen und eine schmerzhaft ulzerierte Oberfläche hinterlassen. Auch hier findet sich peripher eine feine, weiße Streifung (Ismail et al. 2007). Die Läsionen treten insbesondere an der bukkalen Mukosa und den seitlichen Zungenrändern auf (Edwards und Kelsch 2002).

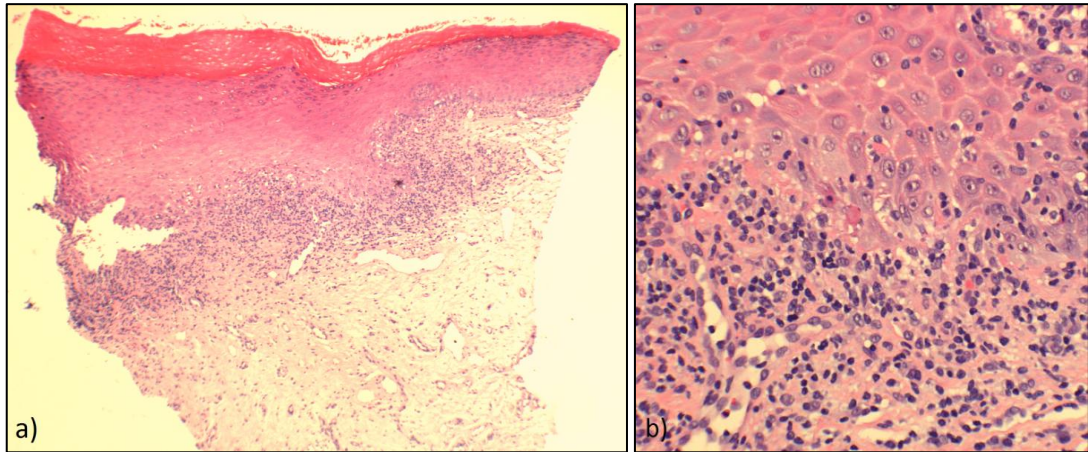
### **1.3 Histopathologie**

Der LP weist ein charakteristisches histopathologisches Bild auf, das dem einer Interface-Dermatitis entspricht (Gorouhi et al. 2014), wobei darauf hinzuweisen ist, dass dieses je nach klinischem Subtyp in verschiedenen Modifikationen auftreten kann (Wagner et al. 2013). Zu einer Interface-Dermatitis werden Dermatosen gezählt, deren primäre Pathologie die dermoepidermale Junktionszone betrifft. Histopathologisch findet sich dabei eine Vakuolisierung der Basalzellen, apoptotische Keratinozyten (Kolloid-Körperchen/zytoide Körperchen) und eine Infiltration von Entzündungszellen im Bereich der dermo-epidermalen Junktionszone (Joshi 2013).

Typischerweise findet sich beim LP im oberen Bereich der Dermis und der dermo-epidermalen Junktionszone ein dichtes bandförmiges Entzündungsinfiltrat (Gorouhi et al. 2014). Dieses setzt sich primär aus Lymphozyten zusammen. Zusätzlich finden sich vereinzelte Histiozyten und neutrophile Granulozyten. Daneben zeigt sich epidermal eine sägezahnartige Akanthose und eine Orthohyperkeratose mit umschriebener keilförmiger Hypergranulose, die das histologische Korrelat zur Wickham'schen Streifung darstellt (Wagner et al. 2013). Zu den weiteren Merkmalen zählt eine basale vakuolige Degeneration, die auch zu Ausbildung von subepidermalen Spalten, sog. Max-Joseph'schen Räumen, führen kann (Gorouhi et al. 2014; Ellis 1967). Die Apoptose basaler Keratinozyten, deren Überreste als zytoide Körperchen auch in der oberen Dermis gefunden werden können, bildet ein weiteres entscheidendes histologisches Merkmal des LP (Gorouhi et al. 2014; Ismail et al. 2007).

Die histologischen Veränderungen der Läsionen vom Zeitpunkt ihrer Eruption, über die Reifung, bis hin zu ihrer Regression konnten durch Ragaz et al. beschrieben werden. Zu Beginn der Läsionsentstehung fanden sich im Entzündungsinfiltrat hauptsächlich Langerhans-Zellen. Das Auftreten einer Lymphozytendominanz während der Reifung geht mit einer Zerstörung der basalen Keratinozyten und einer epidermalen Hyperplasie mit Hypergranulose und Hyperkeratose einher. Mit der Abheilung der Läsion bildet sich das Entzündungsinfiltrat zurück und die Epidermis nimmt wieder ihre physiologische Konfiguration an (Ragaz und Ackerman 1981).

Das histologische Bild des OLP zeigt ebenfalls das typische subepitheliale lymphozytäre Entzündungsinfiltrat, eine erhöhte Zahl intra-epithelialer Lymphozyten und eine Degeneration basaler Keratinozyten, die zytoide Körperchen formen können (Sugerman et al. 2002). Im Gegensatz zum kutanen LP zeigen die Läsionen des OLP kaum Orthokeratosen und eher einen atrophischen Charakter (Gorouhi et al. 2014; Elder 2015). Ferner kann es hier zu strukturellen Veränderungen der Basalmembran und Verankerungselementen der basalen Keratinozyten kommen (Sugerman et al. 2002; Jungell et al. 1989). Zhao et al. konnten innerhalb des Entzündungsinfiltrates von OLP-Läsionen weiterhin eine erhöhte Zahl von Mastzellen nachweisen (Zhao et al. 1997). Dabei lagen diese vermehrt in ihrer degranulierten Form vor (Zhao et al. 2001).



**Abbildung 1.3 Histologischer Schnitt einer OLP-Läsion**

*In der vorliegenden Hämatoxylin-Eosin-Färbung wird das für den LP typische bandförmige subepitheliale lymphozytäre Entzündungsinfiltrat anhand einer Ansammlung intensiv gefärbter Zellen in der oberen Dermis und dermoepidermalen Junktionszone erkennbar. a) Die Übersicht zeigt zudem eine hyperkeratotische Verbreiterung der Epidermis. b) In der Detailaufnahme lassen sich weiter eine Invasion der Entzündungszellen in die basale Epithelreihe, eine vakuolige Degeneration der basalen Keratinozyten, sowie eosinophile zytoide Körperchen erkennen.*

*Quelle: eigene Aufnahme*

## 1.4 Pathophysiologie

Die genaue Ätiologie und Pathogenese des LP bzw. OLP ist bis heute noch nicht vollständig verstanden, jedoch deuten die neueren Forschungsergebnisse immer stärker darauf hin, dass es sich um eine T-Zell gesteuerte Autoimmundermatose handelt.

Genaue histologische Untersuchungen des Entzündungsinfiltrates, wie etwa die Differenzierung der verschiedenen Zellentypen anhand spezifischer Oberflächenstrukturen (Cluster of Differentiation = CD) erlaubten erste Hypothesen zum Pathomechanismus. Das verstärkte Auftreten von T-Lymphozyten im Bereich der Läsionen und die direkte Nachbarschaft von  $CD8^+$  T-Lymphozyten, die den Hauptanteil der infiltrierenden T-Lymphozyten bilden, zu apoptotischen basalen Keratinozyten lassen vermuten, dass diese im Pathomechanismus des LP eine entscheidende Rolle spielen. Dabei wird angenommen, dass  $CD8^+$  zytotoxische T-Zellen ( $T_c$ ) die Apoptose der basalen Keratinozyten induzieren und so das typische Krankheitsbild hervorrufen (Sugerman et al. 2002). Als patrouillierende immunkompetente Zellen sind  $CD8^+$  T-Lymphozyten in der Lage, körpereigene erkrankte oder veränderte Zellen anhand deren Oberflächenantigene zu erkennen. Dies geschieht über den T-Zell-Rezeptor, der für das jeweilige Antigen spezifisch ist. Wird eine Körperzelle als verändert erkannt, wird diese durch die  $T_c$  abgetötet.

Weiterhin lässt eine erhöhte Zahl an  $CD4^+$  T-Zellen, die sich vor allem im Bereich der Lamina propria finden, auch hier eine direkte Beteiligung am Pathomechanismus vermuten (Sugerman



et al. 2002; Khan et al. 2003).  $CD4^+$  T-Zellen sind in der Lage, mittels ihres T-Zell-Rezeptors Antigene, die ihnen von spezialisierten antigenpräsentierenden Zellen, wie zum Beispiel Langerhans-Zellen, dargeboten werden, zu erkennen. Ihre Aktivierung führt über die Freisetzung von Zytokinen zur Proliferation bzw. weiteren Differenzierung etwa in T-Helferzellen (TH1, TH2, TH17) oder regulatorische T-Zellen (Treg). Diese sind wiederum in der Lage, über die Sekretion von Zytokinen weitere Immunprozesse zu steuern (Lüllmann-Rauch 2009). Dabei unterstützen sie etwa B-Zellen bei der Antikörperproduktion, mediieren die Funktionen der  $CD8^+$ -Zellen und Makrophagen und dirigieren das Ausmaß von Immunantworten und das immunologische Gedächtnis (Zhu et al. 2010).

Der Stand der Forschung bezüglich der Rolle der genannten immunkompetenten antigen-spezifischen T-Zellen im Pathomechanismus des LP, aber auch der Beitrag unspezifischer und humoraler Mechanismen zur Krankheitsentstehung soll im Folgenden dargestellt werden.

#### **1.4.1 Antigen-spezifische Steuerung der Immunantwort**

Diese These setzt zunächst die Existenz eines Antigens, gegen welches Immunzellen, wie  $CD4^+$  und  $CD8^+$  Zellen, spezifisch reagieren können, voraus. Zahlreiche Studien beschäftigen sich aktuell mit der Suche nach einem Antigen, gegen das sich die Immunantwort beim LP richten könnte. Es wird dabei vermutet, dass es sich dabei um ein Autoantigen, also ein körpereigenes Protein, handeln könnte, was den LP als eine Autoimmunerkrankung definieren würde. Das höhere Patientenalter bei Krankheitsausbruch, die Assoziation mit anderen Autoimmunerkrankungen, eine reduzierte negative Immunregulation und die Präsenz von autoreaktiven T-Zellen innerhalb der LP-Läsionen sprechen für diese These (Sugerman et al. 2002; Sugerman et al. 2000). Als potentiell Antigen werden beispielsweise Hitzeschockproteine (HSP), welche in erhöhter Anzahl auf Keratinozyten aus OLP-Läsionen gefunden werden konnten, aber auch Bestandteile der Basalmembran in Betracht gezogen (Sugerman et al. 1995). Dennoch ist das LP-Antigen bisher immer noch unbekannt und die Frage, ob eventuell sogar mehrere Antigene beteiligt sind, ungeklärt.

Die Hypothese, dass bei der Pathogenese vermutlich sowohl  $CD4^+$  T-Helferzellen als auch  $CD8^+$  zytotoxische T-Zellen beteiligt sind, wirft weitere Fragen nach der Natur des Antigens auf. Beide Zelltypen werden über eine Antigenpräsentation via Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex = MHC) aktiviert. Dabei erfolgt dies bei  $CD4^+$  Zellen über eine endosomale Prozessierung und anschließende Präsentation über das MHC-II Rezeptormolekül (Nogueira et al. 2015). Die mittels MHC-Klasse-II-Komplex präsentierten Peptide stammen von extrazellulären Proteinen und müssen zunächst über Antigenpräsentierende Zellen, wie beispielsweise Langerhans-Zellen, erkannt, gebunden, aufgenommen und prozes-

siert werden. MHC-Klasse-I-Komplexe, die sich auf der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen befinden, präsentieren dagegen zytosolische Peptide. CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind dabei in der Lage, Veränderungen dieser zellproduzierten Peptide zu erkennen. Bildet die Zelle zum Beispiel aufgrund eines Virusbefalls oder einer Mutation veränderte Peptide, führt dies zu einer Aktivierung der CD8<sup>+</sup> Tc, welche die betroffene Körperzelle vernichtet.

Somit stellt sich die Frage, ob das gesuchte Antigen über beide Wege prozessiert und präsentiert wird oder, ob es sich um zwei unterschiedliche Antigene handelt (Nogueira et al. 2015). Davon unabhängig deutet jedoch vieles darauf hin, dass die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen simultan erfolgt, da nur so eine dauerhafte T-Zellinfiltration und Aktivierung CD8<sup>+</sup> T-Zellen gewährleistet scheint (Sugerman et al. 2002).

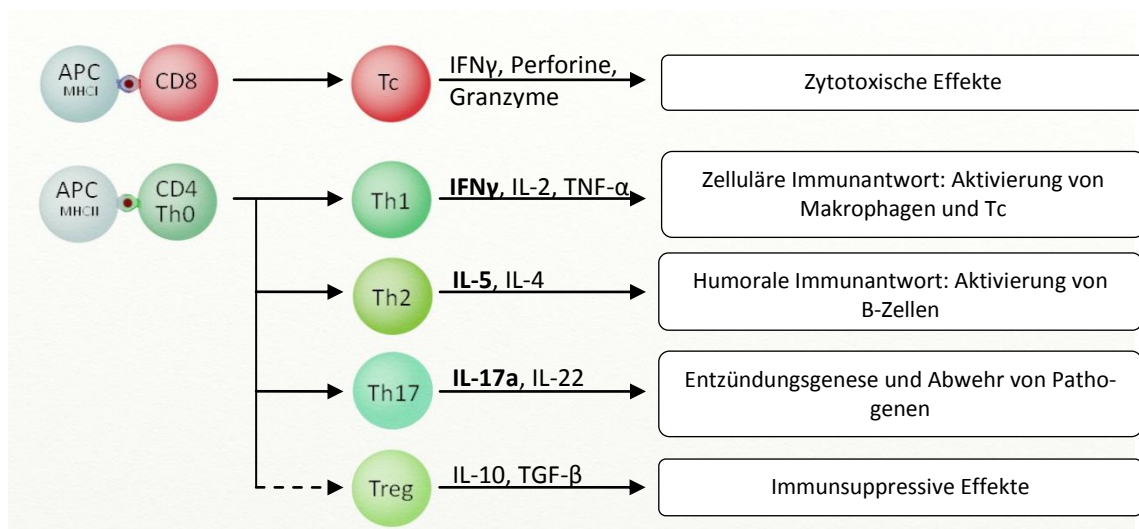
Auch wenn es das Antigen immer noch zu identifizieren gilt, wird seine Lokalisation an den läsionalen basalen Keratinozyten vermutet, da diese den Angriffspunkt der Tc darstellen. Damit es jedoch zu einer Aktivierung der Tc kommen kann, muss das Antigen zunächst entweder demarkiert oder von den Keratinozyten exprimiert und über einen MHC-Klasse-I-Rezeptor präsentiert werden. Die Ursachen für diesen Prozess sind nicht genau geklärt, aber ätiologische Faktoren wie Traumata, bakterielle oder virale Infektionen, Kontaktallergien oder systemische Medikamenteneinnahme werden diskutiert (Sugerman et al. 2002). Es ist anzunehmen, dass diese **Antigenexpression** über den MHC-Klasse-I-Rezeptor den initialen Schritt der antigenspezifischen Immunopathogenese bildet.

Den zweiten Schritt bildet die **Migration der T-Lymphozyten** in das Epithel, denn für eine Induktion der Immunantwort wird ein Kontakt zwischen Immunzellen und Antigen vorausgesetzt. Diesbezüglich werden zwei verschiedene Thesen diskutiert. Dazu zählt zum einen die sogenannte „chance encounter“ Hypothese, bei der davon ausgegangen wird, dass spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die im Gewebe zirkulieren, bei einer „routinemäßigen Kontrolle“ auf das passende Antigen treffen und daraufhin aktiviert werden. Zum zweiten postuliert die „directed migration“-Hypothese, dass die Migration von T-Zellen durch keratinozytäre Chemokine ausgelöst wird. Dabei werden sowohl unspezifische als auch spezifische T-Zellen ins Epithel „gelockt“ (Sugerman et al. 2002).

Im dritten Schritt findet die **Aktivierung der T-Zellen** statt. Dies geschieht bei den CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermutlich über eine Bindung ihres T-Zell-Rezeptors an den MHC-Klasse-I-Komplex eines, mit dem spezifischen Antigen beladenden, Keratinozyten. Sugerman et al. konnten diesen Mechanismus *in vitro* nachweisen, indem sie den MHC-I-Komplex läsionaler Keratinozyten blockierten. Als Folge zeigte sich eine Reduktion der Zytotoxizität autologer läsionaler CD8<sup>+</sup> T-Zellen. In selbiger Studie zeigte sich auch, dass läsionale CD8<sup>+</sup> Zellen eine höhere Zytotoxizität gegenüber

autologen Keratinozyten als gegenüber solchen gesunder Hautareale aufweisen (Sugerman et al. 2000). Letzteres legt nahe, dass die Keratinozyten das gesuchte Antigen nur im Bereich der eigentlichen Läsion, nicht jedoch in gesunden Hautarealen, exprimieren.

Die Aktivierung der  $CD4^+$  T-Zellen erfolgt über eine Antigenpräsentation via MHC-Klasse-II-Rezeptormolekül. Ob es sich dabei um ein MHC-Klasse-II-Rezeptormolekül der Keratinozyten, Langerhans-Zellen oder anderer antigenpräsentierender Zellen handelt, ist bisher nicht geklärt. Farthing et al. konnten jedoch zeigen, dass sich innerhalb des Infiltrats sowohl Langerhans-Zellen als auch Keratinozyten mit einer erhöhten MHC-Klasse-II-Rezeptor-Expression finden (Farthing et al. 1990; Farthing und Cruchley 1989). Die Aktivierung der  $CD4^+$  T-Lymphozyten leitet eine Reihe von biochemischen Prozessen ein. Die Aktivierung führt initial zu einer Produktion von Interleukin-2 (IL-2), welches zunächst zu einer Proliferation und Ausbildung eines TH0 Typs führt. Aus diesem können sich verschiedene T-Effektorzellen differenzieren, die die Immunantwort auf unterschiedliche Art und Weise beeinflussen. Dazu zählen die T-Helferzellen 1, 2 und 17 aber auch bestimmte Subpopulationen der regulatorischen T-Zellen (Treg).



**Abbildung 1.4 Übersicht über die verschiedenen T-Zellsubpopulationen, ihre Zytokine und ihre Hauptfunktion**

APC = Antigenpräsentierende Zelle

Quelle: Eigene Darstellung

TH1-Zellen produzieren vor allem Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), IL-2 und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und induzieren somit eine überwiegend zelluläre Immunantwort (Löffler et al. 2007; Wang et al. 2015b). Dabei sind die genannten Zytokine in der Lage, Makrophagen und zytotoxische T-Lymphozyten zu aktivieren und somit die Immunantwort auf zellulärer Ebene zu steuern.

ern (Wang et al. 2015b). Ihre Differenzierung kann zum Beispiel durch IL-12, IL-18 sowie IFN $\gamma$  induziert werden.

TH2-Zellen dagegen produzieren vor allem IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 und IL-13 und tragen so zur Aktivierung naiver B-Zellen und damit einer Antikörper-abhängigen humoralen Immunantwort bei (Löffler et al. 2007). IL-4 oder IL-5 wird dabei häufig als Markerzytokin für eine TH2-Immunantwort herangezogen. TH1 und TH2 sind in der Lage, die Ausbildung des jeweils anderen Subtyps zu unterdrücken, sodass es meist zu einer Dominanz eines Immunantwortstyps kommt.

Ein weiterer, erst vor einigen Jahren entdeckter, T-Helferzelltyp wird durch die TH17-Zellen, die sich durch die Sekretion von IL-17a, IL-17f und IL-22 auszeichnen, repräsentiert (Zhu et al. 2010). TH17-Zellen und das zentrale TH17-assoziierte Zytokin IL-17a spielen eine entscheidende Rolle sowohl in der Abwehr von Pathogenen, wie extrazellulären Mikroorganismen, als auch bei der Genese von Entzündungen und Autoimmunität (Miossec und Kolls 2012; Isailovic et al. 2015). Die Induktion naiver T-Zellen zu TH17 wird dabei vermutlich durch Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), IL-6, IL-21 und IL-23 ausgelöst (Miossec und Kolls 2012).

Die Rolle dieser verschiedenen CD4<sup>+</sup> T-Effektorzelltypen in der Pathogenese des LP ist Gegenstand der aktuellen Forschung. So zeigte sich, dass dem LP eine TH1-Tendenz zugrunde liegt (Wang et al. 2015b). Die Differenzierung von TH0 zu TH1-Zellen und die Zytokinproduktion könnten dabei durch eine erhöhte IL-12 Freisetzung und vermehrte Expression von CD80 durch läsionale MHC-Klasse-II<sup>+</sup> Antigenpräsentierende Zellen getriggert werden. Die TH1-Zellen reagieren darauf mit einer vermehrten Ausschüttung von IL-2 und IFN $\gamma$  (Farhi und Dupin 2010; Sugerman et al. 2002). Diese beiden Zytokine wiederum scheinen die Aktivierung der CD8<sup>+</sup> Tc und dadurch induzierten Apoptose der basalen Keratinozyten zu unterstützen. Gleichzeitig wird vermutet, dass auch die CD8<sup>+</sup> T-Zellen die TH1-Antwort durch Stimulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen verstärken (Sugerman et al. 2002). Dennoch sollte eine Beteiligung von TH2-Zellen an der Pathogenese nicht gänzlich ausgeschlossen werden. So konnten etwa Wang et al. erhöhte Level des TH2-Zytokins IL-4 im Serum und Läsionsgewebe von OLP-Patienten nachweisen, was Anlass gibt, auch humorale Mechanismen bei der Krankheitsentstehung in Betracht zu ziehen (Wang et al. 2015b).

Neben einer erhöhten Zahl an TH1-Zellen konnten Xie et al. auch erhöhte Level an TH17-Zellen sowohl in der Lamina propria von OLP-Läsionen als auch im peripheren Blut von OLP-Patienten nachweisen. In selbiger Studie zeigte sich zudem eine erhöhte Konzentration des proinflammatorischen Effektorinterleukins IL-17a im Serum der Patienten. Auch bei Patienten mit kutanem LP konnten erhöhte Serumlevel dieses Zytokins detektiert werden (Shaker und

Hassan 2012). Dabei könnte IL-17a sowohl über eine Verstärkung der T-Zell-medierten Mechanismen, eine Degranulation von Mastzellen oder eine Aktivierung von Matrixmetalloproteasen (MMP) zur Pathogenese des LP beitragen (Shaker und Hassan 2012).

Eine weitere CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation, die an der Pathogenese des LP beteiligt sein könnte, wird durch die Treg gebildet. Treg können beispielsweise über eine Produktion von IL-10 und TGF- $\beta$  eine immunsuppressive Wirkung auslösen und damit Autoimmunität verhindern (Löffler et al. 2007; Shen et al. 2014). Für ihre Identifizierung innerhalb von T-Zellpopulationen wird neben den CD-Oberflächenantigenen auch häufig der Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3) als Marker herangezogen (Zheng und Rudensky 2007). Innerhalb der Treg-Population unterscheidet man die natürlichen, im Thymus entstandenen, zellkontaktabhängigen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> Treg (nTreg) von den induzierten Treg (iTreg), Tr1 und Th3 (Shevach 2000). Treg sind, über eine Sekretion von TGF- $\beta$  und IL-10, in der Lage, die Aktivität und Differenzierung von Effektor-T-Zellen und Antigenpräsentierenden Zellen zu unterdrücken (Firth et al. 2015; Taylor et al. 2006; Khan et al. 2003). Veränderungen der Zahl und Funktionalität von Treg konnten bereits bei verschiedenen entzündlichen Autoimmunerkrankungen nachgewiesen werden (Shen et al. 2014; Miyara und Sakaguchi 2011). In Bezug auf den LP konnten etwa Firth et al. und Shen et al. eine erhöhte Zahl an FoxP3<sup>+</sup> Zellen im läsionalen Gewebe von Patienten mit oralem bzw. kutanem LP feststellen (Firth et al. 2015; Shen et al. 2014). Dabei war die Anzahl der FoxP3<sup>+</sup> Zellen im oralen Gewebe gegenüber der im kutanen signifikant erhöht (Shen et al. 2014). Die erhöhte Präsenz der Treg könnte somit als Reaktion auf die verstärkte Infiltration der Effektor-T-Zellen gedeutet werden (Shen et al. 2014). Die Wirkung des Effektorzytokins TGF- $\beta$ , kann jedoch durch das proinflammatorische Zytokin IFN $\gamma$  herabreguliert werden (Sugerman et al. 2002). Somit könnte eine Imbalance dieser Zytokine bzw. der TH1 und Treg Zellen eine erste Erklärung für den chronisch-rezidivierenden Charakter des LP geben.

Im vierten Schritt kommt es zu der durch CD8<sup>+</sup> Tc induzierten **Apoptose der basalen Keratinozyten**. Auch hier werden verschiedene Hypothesen bezüglich der genauen Induktionsmechanismen diskutiert (Lodi et al. 2005a). Am Ende steht jedoch immer die Zytolyse der betroffenen Zellen.

Diese kann zum einen durch die Freisetzung der Inhaltsstoffe zytolytischer Granula aus den Tc erfolgen. Diese enthalten beispielsweise das Protein Perforin, welches zu einer Porenbildung in der Plasmamembran der Zielzellen führt. Weiterhin enthalten sind Granzyme, proteinspaltende Serinproteasen, wie etwa Granzym B, welche nun durch die neu entstandenen Membranporen in die Zielzelle gelangen können. Sie führen zu einer Aktivierung der Caspasen-Kaskade, einer apoptoseinduzierenden proteolytischen Signalkaskade und damit zum pro-

grammierten Zelltod (Löffler et al. 2007). In einem Vergleich mit gesunden Kontrollen konnten etwa Gaber et al. eine signifikant erhöhte Perforinexpression in der Epidermis läsionaler Haut von LP-Patienten nachweisen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die höchste Dichte Perforin<sup>+</sup> Zellen im Bereich der Basalmembran vorhanden war, also dem Ort der Infiltration der Tc (Gaber et al. 2014).

Ein weiterer Weg zur Zelllyse führt über die Expression des Fas Liganden (FasL/ CD95L) auf der T-Zelloberfläche, welcher an das Protein Fas (FasR, CD95) auf der Oberfläche der Keratinozyten bindet (Farhi und Dupin 2010). Der FasL bildet ein transmembranöses Protein, welches zur TNF- $\alpha$ -Familie gezählt wird und auf aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird. Bindet er an den Apoptose-Rezeptor Fas, wird über eine intrazelluläre Signalkaskade mit der Ausbildung eines sogenannten „death-inducing signaling complex“, wiederum eine Caspasenkaskade ausgelöst, die schließlich die Apoptose der Zelle einleitet.

Den dritten Weg stellt eine Apoptoseinduktion über das, von den zytotoxischen T-Zellen sezernierte, Zytokin TNF $\alpha$  dar. Dieses kann an den TNF $\alpha$  Rezeptor 1 (TNF R1) auf der Oberfläche der Keratinozyten binden und wiederum die Caspasenkaskade aktivieren. Dabei konnten Kahn et al. das Vorhandensein des TNF R1 auf basalen und suprabasalen Keratinozyten innerhalb von OLP-Läsionen nachweisen (Khan et al. 2003). Während Sugerman et al. zeigen konnten, dass TNF $\alpha$  durch T-Zellen sowohl im subepithelialen Infiltrat als auch in der direkten Umgebung basaler Keratinozyten in OLP-Läsionen exprimiert wird (Sugerman et al. 2002).

#### **1.4.2 Unspezifische Mechanismen**

Es wird vermutet, dass neben den beschriebenen antigenspezifischen Mechanismen auch verschiedene, auf einer bereits bestehenden Entzündung beruhende, Faktoren, wie etwa Chemokine, Mastzellen oder MMP etwa, über die Rekrutierung von Entzündungszellen oder die Destruktion der Basalmembran aktiv zum Entzündungsgeschehen und der Pathogenese beitragen (Sugerman et al. 2002). Die Analyse des T-Zellinfiltrats bei OLP-Patienten konnte zeigen, dass keineswegs alle infiltrierenden T-Lymphozyten aktiviert sind oder eine Antigen-spezifität aufweisen (Sugerman et al. 2000; Walton et al. 1998; Zhou et al. 1996).

**Chemokine** bilden eine Gruppe von kleinen Zytokinen, welche insbesondere an der Rekrutierung oder aber auch an der Aktivierung von Immunzellen beteiligt sind. Die Zielzellen folgen dabei dem Konzentrationsgradient des sezernierten Chemokins und sind somit in der Lage, aus der Peripherie in das inflammatorische Zielgewebe einzuwandern. Diese zielgerichtete Bewegung der Lymphozyten bezeichnet man auch als Chemotaxis. Ihre Einteilung erfolgt anhand N-terminaler Cysteingruppen in vier Subtypen. CXC, CC, C, und CX3C (Iijima et al. 2003). Ihre spezifische Wirkung erlangen die Chemokine durch eine Bindung an den korrespondierenden Re-

zeptor. Dabei zeigt sich ein direkter Zusammenhang zwischen TH-Zelltyp und dem Chemokinrezeptorprofil. TH1-Zellen exprimieren beispielsweise selektiv CCR5/CXCR3, TH2 Zellen CCR3, CCR4, und CCR8 (Yoshie et al. 2001).

Studien bezüglich des kutanen LP konnten zeigen, dass sowohl basale Keratinozyten als auch mononukleäre Zellen des Infiltrats das CC-Chemokin „monocyte chemoattractant protein“ MCP-1 und die CXC-Chemokine „monokine induced by gamma-interferon“ MIG/CXCL9 und „interferon-gamma-inducible protein-10“ IP-10/CXCL10 verstärkt sezernieren (Spandau et al. 1998). Dies würde die Hypothese einer TH1-Immunantwort beim LP unterstützen. Dabei scheint auch der entsprechende Rezeptor CXCR3 auf den infiltrierenden T-Zellen verstärkt exprimiert zu werden (Iijima et al. 2003). Iijima et al. konnten anhand immunhistologischer *in situ*-Untersuchungen neben den bereits durch Spandau beschriebenen Cytokinen CXCL9, CXCL10 einen weiteren Liganden des CXCR3, I-TAC/CXCL11 bei Patienten mit OLP nachweisen (Iijima et al. 2003). Spandau et al. zeigten weiterhin, dass die Expression von „regulated on activation, normal T cell expressed and secreted“ RANTES/CCL5 in Läsionen des kutanen LP eher moderat ausfiel, maßen ihm jedoch eine gewisse Rolle in der Pathogenese zu (Spandau et al. 1998). Bei Studien zum OLP konnte dieses Chemokin, welches unter anderem durch aktivierte T-Zellen produziert wird und bei der Rekrutierung von Lymphozyten und Mastzellen eine entscheidende Rolle spielt, allerdings verstärkt nachgewiesen werden (Sugerman et al. 2002; Zhao et al. 2002). Zhao et al. konnten dabei erstmals zeigen, dass nicht nur CCL5, sondern auch einer seiner Rezeptoren CCR1 auf T-Zellen und Mastzellen in OLP-Läsionen verstärkt nachweisbar sind. Außerdem konnten sie eine Degranulation dieser Mastzellen mit Freisetzung von TNF $\alpha$  und Histamin nachweisen. Dass CCL5 spezifisch an dieser Migration und Aktivierung der Mastzellen beteiligt zu sein scheint, konnte durch eine Zugabe von anti-CCL-Antikörpern gezeigt werden. Diese führten zu einer verminderten Migration bzw. Degranulation der Mastzellen (Zhao et al. 2002; Zhao et al. 2001). Ein weiterer Rezeptor von CCL5, CCR5, konnte von Iijima et al. bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen des Entzündungsinfiltrates von OLP-Patienten nachgewiesen werden. Zeitgleich gelang ihm der Nachweis CCL5-haltiger Granula in läsionalen CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Iijima et al. 2003). Berücksichtigt man Studien zur kutanen und oralen Form, konnten bisher insgesamt sechs CCL5-Rezeptoren im LP identifiziert werden. Dies sind CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CCR9 und CCR10 (Nogueira et al. 2015). Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass CCL5 zu einer Rekrutierung von Mastzellen und T-Zellen in die beginnende OLP-Läsion führt. Dort kommt es zur Aktivierung von T-Zellen bzw. zur Mastzelldegranulation mit Freisetzung von TNF $\alpha$ , welches neben der apoptoseinduzierenden Wirkung auch zusätzlich eine rückkoppelnde Wirkung auf die T-Zellen hat und ihre CCL5 Sekretion steigert. Solche Selbstrekrutierungsprozesse könnten eine mögliche Erklärung für den chronischen Charakter des LP lie-

fern (Sugerman et al. 2002). Neben dem bereits erwähnten TNF $\alpha$  werden bei der Degranulation von Mastzellen weitere Stoffe freigesetzt, die am Entzündungsgeschehen teilhaben. Dazu zählen etwa Chymase und Trypase, die an der Aktivierung von MMP beteiligt sind. TNF $\alpha$  steigert neben der CCL5-Sekretion, auch die Expression endothelialer Zelladhäsionsmoleküle wie CD62E, CD54, und CD106, welche für eine Lymphozytenadhäsion und -extravasation bedeutend sind. Daneben verstärkt es die Ausschüttung von MMP, wie etwa der MMP9. MMP bilden eine Familie Zink-abhängiger Endo-Proteinasen, also enzymspaltender Proteine, die insbesondere am Ab-/Umbau der Extrazellulären Matrix beteiligt sind und somit auch zum Abbau der Basalmembran innerhalb der Pathogenese des LP beitragen könnten (Sugerman et al. 2002).

### **1.4.3 Humorale Mechanismen**

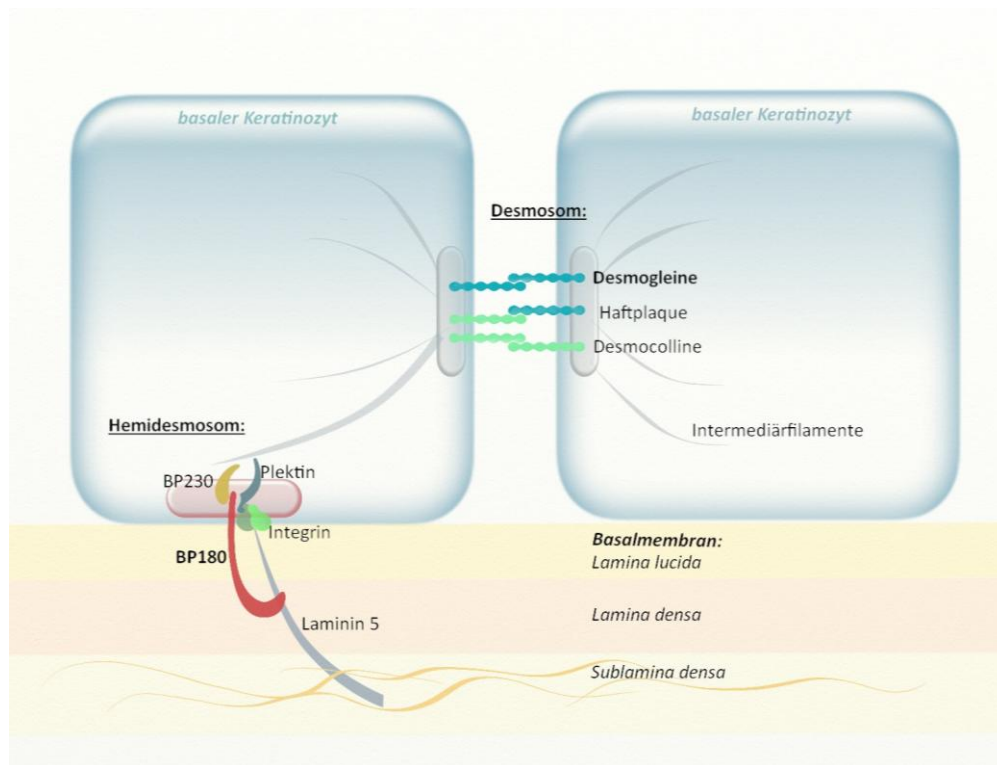
Nicht nur der Nachweis von TH2-Zytokinen bei OLP-Patienten oder von TH2-spezifischen CCL5-Rezeptoren bietet Anlass, auch humorale, also nichtzelluläre, antikörper- und komplementgesteuerte Mechanismen in der Pathogenese des LP in Betracht zu ziehen (Wang et al. 2015b; Nogueira et al. 2015). Die humoralen Mechanismen in der Pathogenese sind bisher noch wenig erforscht und die Ergebnisse zum Teil widersprüchlich. Im Bereich der läsionalen Basalmembran wurden bereits Ablagerungen des Komplementfaktors C3 und verschiedener Immunglobuline (Ig) festgestellt (Hashimoto et al. 2015). Weiterhin konnten Lukac et al. erhöhte Titer zirkulierender Autoantikörper gegen Desmoglein 1 (Dsg1) und Desmoglein 3 (Dsg3) im Serum von OLP-Patienten nachweisen. Dabei fanden sich diese insbesondere bei der erosiven Form des OLP (Lukac et al. 2006). Gholizadeh et al. konnten die Ergebnisse für erhöhte AK-Titer gegen Dsg3, nicht jedoch für Dsg1 bestätigen, wobei sie Dsg1 dennoch eine mögliche Rolle in der Pathogenese der kutanen LP-Form zuordnen (Gholizadeh et al. 2015). Desmogleine bilden als integrale Membranproteine einen entscheidenden Bestandteil von Desmosomen (Macula adherens), den Haftkontakten zwischen Epithelzellen, die zu einer interzellulären Verknüpfung der Intermediärfilamente verschiedener Zellen und damit zur mechanischen Stabilität des gesamten Epithels beitragen. Die zu den Cadherinen zählenden, calciumabhängigen, Desmogleine sind über verschiedene Plaqueproteine an der Plasmamembran verankert und bilden zusammen mit Desmocollinen (Dsc) extrazelluläre Kontakte zwischen den benachbarten Zellen aus. Dabei setzen sich Desmogleine aus fünf extrazellulären, sowie einer intrazellulären und transmembranösen Domäne zusammen. Desmosomale Cadherine, können aber auch „extradesmosomal“ in Verbindung mit Aktinfilamenten beobachtet werden, wobei ihnen hier eine Rolle in der Signalübertragung zukommt. Bisher sind vier verschiedene Desmogleine und drei Desmocolline beschrieben worden, dazu zählen Dsg 1, 2, 3 und 4 sowie Dsc 1, 2 und 3.



Diese können charakteristische Lokalisationen innerhalb des Gewebes aufweisen. So finden sich bei einfachen Epithelien aber auch bei Kardiomyozyten ausschließlich Dsg2 und Dsc2. Bei komplexen Epithelien dagegen, orientiert sich die Verteilung der desmosomalen Cadherine an den verschiedenen Epithelschichten. So finden sich Dsg3, Dsc2 und Dsc3 primär in tieferen Epithelschichten, während Dsg1, Dsg4 und Dsc1 vor allem in den oberen Epidermisschichten exprimiert werden (Waschke und Spindler 2014). Dsg1 und Dsg3 konnten bereits als Autoantigene des Pemphigus vulgaris (PV), einer blasenbildenden Autoimmundermatose, deren mukosale Form starke klinische Ähnlichkeit zu den erosiven Formen des OLP aufweist, identifiziert werden (Amber et al. 2013). Dabei wird vermutet, dass die AK die extrazelluläre Verbindung der Desmogleine zum einen räumlich, also direkt inhibieren („sterische Hinderung“) und zum anderen über eine Veränderung der Signalübertragung indirekt zur Pathogenese beitragen. So könnte etwa der interzelluläre Kontaktverlust der Desmogleinproteine indirekt zu Veränderungen des desmosomalen turnovers und der zytoskelettalen Verankerungsmechanismen führen und somit einen weiteren Zellkontaktverlust fördern (Waschke und Spindler 2014).

Auch Autoantikörper gegen das Bullöse Pemphigoid Antigen (BP180)/Kollagen XVII/BPAG2 und BP230/BPAG1 wurden aufgrund der starken klinischen und histopathologischen Analogie der LP- und BP-Erkrankungen bezüglich der Pathogenese des LP untersucht (s. auch Lichen planus pemphigoides 1.1). Dabei wurden geringe Titer insbesondere der anti-BP180 AK, vorwiegend bei erosiven LP-Formen festgestellt (Cooper et al. 2005; Buijsrogge et al. 2007; Herrero-González et al. 2015). Das transmembranöse Homotrimer BP180/Kollagen XVII bildet einen wichtigen Baustein der Hemidesmosomen, zellulären Haftkontakten, die einen strukturellen Verbund basaler Epithelzellen mit der darunterliegenden Basalmembran sicherstellen. Dieser wird über den extrazellulären C-Terminus via Protein-Proteinkontakten zur Lamina densa der Basalmembran gebildet (Franzke et al. 2005). Als Liganden dienen dabei etwa  $\alpha 6$  Integrin oder Laminin 5. Der N-Terminus dagegen dient der intrazellulären Verankerung. Die Verbindung zu den intrazellulären Intermediärfilamenten kann dabei etwa über BP230 oder Plectin innerhalb der Haftplaque realisiert werden (Powell et al. 2005).

Inwiefern die genannten AK auch einen Teil der Pathogenese des LP bilden, bleibt noch zu klären, dennoch bieten die entsprechenden antigenen Strukturen Anlass, als potentielle Autoantigene des LP in Betracht gezogen zu werden.



**Abbildung 1.5** Schematische Darstellung der desmosomalen und hemidesmosomalen Haftkontakte im Bereich der dermo-epidermalen Junctionszone

Quelle: eigene Darstellung

## 1.5 Ätiologie

Die Ätiologie des LP ist unbekannt. Im Bezug auf den OLP werden systemische Faktoren, wie genetische Ursachen, Medikamente, Viren, chronische Lebererkrankungen, Stress oder (Auto-)Immunerkrankungen und lokale Faktoren, wie Nahrungsmittel, Tabak oder Dentalmaterialien als potentielle Ursachen diskutiert (Roopashree et al. 2010; Ismail et al. 2007). Bei der kutanen Form stehen vor allem systemische Ursachen, wie immungenetische Faktoren, Virusinfektionen z.B. mit dem Hepatitis C Virus oder humanen Papillomaviren, Stress oder Autoimmunerkrankungen im Fokus (Gorouhi et al. 2014).

## 1.6 Diagnose

Die Diagnose des LP lässt sich, im Falle vorliegender aktiver Läsionen, anhand der typischen Effloreszenzen häufig schon klinisch stellen. Eine Biopsie bietet weitere diagnostische Möglichkeiten. Die direkte Immunofluoreszenzmikroskopie, kann insbesondere bei der erosiven Form des OLP oder bullösen Form des kutanen LP herangezogen werden um evtl. Differentialdiagnosen auszuschließen (Gorouhi et al. 2014).

## **1.7 Differentialdiagnose**

Die Differentialdiagnose des LP ist mannigfaltig und abhängig von der jeweiligen klinischen Form. Während für die klassische Form des kutanen LP Psoriasis, Lichen simplex chronicus, chronischer kutaner Lupus erythematosus oder Pityriasis rosea als Differentialdiagnose in Frage kommen, müssen für die bullöse Form des LP BP oder PV in Betracht gezogen werden (Gorouhi et al. 2014). Bei der oralen Form des LP kommt bei Leukoplakien etwa Candidiose, Lichen sclerosus, lichenoiden Kontaktreaktionen, sekundäre Syphilis oder Morsicatio buccarum als Differentialdiagnose in Frage. Bei den erosiven OLP-Läsionen kommen Erythema multiforme, PV, Aphten, oder das BP in Betracht (Gorouhi et al. 2014; Nico et al. 2011). Inwieweit der OLP im Zusammenhang mit der Graft-versus-Host-Disease, mit welcher er klinisch und histopathologisch enorme Ähnlichkeit aufweist, steht, ist noch zu klären (Sugerman et al. 2002; Fujii et al. 1988).

## **1.8 Behandlung**

Eine Heilung des LP ist bisher nicht möglich und die Therapieerfolge, insbesondere beim OLP, sind nicht immer zufriedenstellend (Usatine und Tinitigan 2011). Aufgrund der Tatsache, dass die genaue Pathogenese des LP bisher nicht vollständig geklärt werden konnte, stellt sich die Suche nach einer spezifischen Therapie als schwierig dar. Daher sind sowohl für die Therapie der kutanen als auch der intraoralen Formen eine Vielzahl von Substanzen im Einsatz. Bisher konnte sich jedoch keine der Therapien als Standard durchsetzen. Zum Einsatz kommen etwa topische und systemische Kortikosteroide, Retinoide, Calcineurininhibitoren, Immunsuppressiva, Phototherapien oder Biologika. Durch diese symptomatischen Therapien wird versucht, den Rückgang der Läsionen zu beschleunigen, die Beschwerden der Patienten zu lindern und so die Lebensqualität der Betroffenen zu erhöhen. Dabei sind für viele Therapien die Effektivität und Sicherheit im Zusammenhang mit dem LP noch nicht vollständig erforscht (Fazel 2015). Häufig bringen insbesondere die systemischen Therapien eine Reihe schwerwiegender Nebenwirkungen mit sich.

Neben einer medikamentösen Therapie sollten zudem potentielle Reizfaktoren, wie etwa Stress oder bestimmte Medikamente, beseitigt bzw. gemieden werden.

Beim OLP spielen außerdem auch eine Reihe zahnmedizinischer Maßnahmen eine therapeutisch bedeutsame Rolle. So konnten Ramón-Fluixá et al. zeigen, dass erhöhte Plaque- und Zahnsteinlevel, die mit einer erhöhten Keimbeseidlung der Mundhöhle vergesellschaftet sind, mit einem signifikant erhöhten Auftreten atrophisch-erosiver OLP-Läsionen assoziiert ist (Ramón-Fluixá et al. 1999). Umgekehrt zog eine Reduktion dieser Risikofaktoren eine Verbesserung der genannten Läsionen nach sich (Holmstrup et al. 1990).

Bis zur genauen Aufklärung des Pathomechanismus und bis zur Entwicklung einer kurativen Therapie richtet sich der Fokus der Forschung auch auf die Erforschung und Entwicklung alternativer, nebenwirkungsarmer symptomatischer Therapiemaßnahmen. Eine dieser Therapiemaßnahmen, die Photodynamische Therapie (PDT), könnte etwa für den OLP eine vielversprechende Alternative zu den bisherigen Therapien bilden.

## **1.9 Photodynamische Therapie**

Bei der PDT bzw. Photochemotherapie handelt es sich um eine Form der Phototherapie, die zur schonenden und effektiven Behandlung von Gewebsveränderungen herangezogen wird. Die Ursprünge der PDT gehen auf den Anfang des 20. Jahrhunderts zurück und seitdem fand sie Anwendung in zahlreichen Bereichen der Medizin. Dazu zählen etwa die Onkologie, die Dermatologie, die Zahnmedizin oder die Augenheilkunde. Das Prinzip der PDT beruht auf dem Einsatz einer Lichtquelle mit bestimmter Wellenlänge in Kombination mit einer lichtsensitiven, primär nichttoxischen Substanz, deren Aktivierung zu einer Bildung toxischer Sauerstoffformen, wie Singulett-Sauerstoff oder Superoxiden, im Gewebe führt. Über Oxidationsprozesse, die schließlich zur Nekrose oder Apoptose der Zielzellen führen, kommt es zu einer gezielten Destruktion des Zielgewebes (Nelke et al. 2014; Huang 2005).

Die topisch oder systemisch applizierten, lichtaktivierbaren Substanzen werden auch als Photosensibilisatoren (PS) bezeichnet und sind in der Lage, sich selektiv im Zielgewebe anzureichern. Diese Zielgewebe können, neben kanzerogen veränderten Geweben auch durch Bakterien, Pilze oder Viren infizierte Gewebe sein (Mostafa und Tarakji 2015). In der PDT kommen porphyrinbasierte PS, wie Photofrin oder 5-Aminolävulinsäure, chlorophyllbasierte PS, wie Chlorine, Purpurine oder Bakteriochlorine oder bestimmte Farbstoffe, wie Phtalocyanine oder Naphthalocyanine, zum Einsatz (Huang 2005).

Als Lichtquellen eignen sich besonders Laser bestimmter Wellenlängen, jedoch werden auch LEDs oder Breitbandstrahler eingesetzt (Mostafa und Tarakji 2015).

Die Vorteile der PDT sind vor allem die sichere, einfache und nichtinvasive Anwendung und die selektive Toxizität. Gesundes Nachbargewebe nimmt keinen Schaden. Dadurch können die Nebenwirkungen, vor allem bei topischer Anwendung, auf ein Minimum reduziert werden (Mostafa und Tarakji 2015). Bei systemischer Anwendung ist jedoch eine mögliche posttherapeutische Photosensibilität als Nebenwirkung zu nennen.

Aufgrund der genannten Vorteile wurde die Wirkungsweise der PDT unlängst auch in der Behandlung des OLP erprobt. Erste Ergebnisse sind vielversprechend. So konnten etwa Sadaksharam et al. in einer klinischen Studie mit 20 OLP-Patienten, nach viermaliger PDT mit Methylenblau, eine signifikante Reduktion der Krankheitszeichen und Symptome bei gleichzei-

tigem Fehlen von Nebenwirkungen feststellen (Sadaksharam et al. 2012). Dennoch stehen diese Forschungen noch am Anfang. Für eine genaue Aufklärung der Wirkungsweise und Effektivität der PDT beim OLP sind weitere Studien notwendig.

## 2 FRAGESTELLUNG UND HYPOTHESEN

### 2.1 Studienteil A: Pathomechanismen des Lichen planus

Der genaue Pathomechanismus und die Ätiologie des LP konnten bisher nicht vollständig geklärt werden. Eine T-Zell-gesteuerte Autoimmunpathogenese mit einer Beteiligung sowohl  $CD8^+$  Tc als auch  $CD4^+$  TH und Treg bildet jedoch die Grundlage der aktuellen Forschung. Das bzw. die auslösende/n Autoantigen/e konnte/n dabei bisher nicht identifiziert werden. Die vorliegende Arbeit soll zu einem besseren Verständnis der Pathogenese des LP und der Identifizierung eines möglichen LP-Antigens beitragen.

#### **Hypothese: „Im LP lassen sich antigenspezifische (Dsg1, Dsg3, BP180) T-Zellen nachweisen“**

Der LP zeigt in seinem klinischen, histo- und immunopathologischen Bild zum Teil bedeutende Ähnlichkeit zu zwei anderen blasenbildenden antikörpermedierten Autoimmundermatosen, deren Autoantigene bereits identifiziert werden konnten. Für den kutanen LP, genauer gesagt für den Lichen planus pemphigoides wird diese durch das BP repräsentiert (Willsteed et al. 1991). Hier binden Autoantikörper an zwei Strukturen der Basalmembran. Diese sind BP180 und das BP230, wobei das transmembranöse BP180 die wichtigere Rolle zu spielen scheint. Die erosiven Formen des OLP dagegen finden ihr potentiell klinisches Äquivalent im PV der Schleimhäute. Hier bilden sich Autoimmunantikörper gegen Dsg1 und Dsg3 (Amber et al. 2013) (vergleiche auch Kapitel 1.4.3). Bei LP-Patienten konnten bereits AK gegen diese Autoantigene nachgewiesen werden (Lukac et al. 2006; Buijsrogge et al. 2007; Gholizadeh et al. 2015). Zudem konnten Takahashi et al. im PV-Mausmodell zeigen, dass Dsg3-spezifische  $CD4^+$  T-Zellen, phänotypisch eine typische Interface-Dermatitis hervorrufen (Takahashi et al. 2011). Diese tritt auch beim LP auf und könnte auf eine ähnlich Pathogenese hindeuten. Die starke Analogie der Erkrankungen und die Hinweise der neueren Forschung bieten demnach Anlass, die beschriebenen Autoantigene BP180, Dsg1 und Dsg3 auch als potentielle Autoantigene in der Immunpathogenese des LP zu prüfen. Anhand einer Stimulation peripherer T-Zellen mit diesen potentiellen Autoantigenen soll in der vorliegenden Arbeit ein Profil der reaktiven T-Zellantworten erstellt werden. Zudem soll eine Analyse der Chemokin- und Zytokinlevel im Plasma des peripheren Blutes, zusätzlich Antworten über antigenunspezifische Immunantworten in der Pathogenese des LP liefern. Als Vergleichsgruppen wurden gesunde Kontrollen und BP-Patienten herangezogen. Die Analysen wurden anhand folgender Methoden durchgeführt.

- **Bestimmung der plasmatischen Chemokin- und Zytokinlevel mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) (CXCL10, CCL5, IL-8, IFN $\gamma$ , IL-5, IL-17a)**

- **Charakterisierung peripherer T-Zellantworten (Zytokinsekretion) nach Stimulation mit verschiedenen potentiellen Autoantigenen der Haut im Enzyme-linked Immunospot Assay (ELISpot-Assay) (IFN $\gamma$ , IL-5, IL-17a)**

## **2.2        Studienteil B: Photodynamische Therapie des oralen Lichen planus**

Eine kurative Therapie des LP konnte bislang nicht gefunden werden und einige der symptomatischen medikamentösen Therapiemethoden sind mit einer Vielzahl von zum Teil schweren Nebenwirkungen verbunden. Die PDT könnte eine alternative, sichere und beinahe nebenwirkungsfreie Therapieoption des OLP darstellen.

**Hypothese: „Die PDT führt zu einer Reduktion der Entzündungsparameter“**

In dieser Arbeit sollen die Effektivität und der Wirkmechanismus dieser vielversprechenden Therapiemöglichkeit anhand einer T-Zell-fokussierten Analyse genauer untersucht werden. Dafür sollen prä- und posttherapeutisch Proben von, durch die PDT behandelten, OLP-Patienten anhand der folgenden Parameter untersucht und verglichen werden.

- **Durchflusszytometrische Analyse peripherer T-Zellsubpopulation (Treg, CD8 $^{+}$ , CD4 $^{+}$ , TCR, CCR4, CD27 $^{+}$ , CD137 $^{+}$ )**
- **Bestimmung der Chemokin- und Zytokinlevel im Plasma und im Speichel mittels ELISA (CXCL10, CCL5, IL-8, IFN $\gamma$ , IL-5, IL-17a)**
- **Charakterisierung peripherer T-Zellantworten (Zytokinsekretion) nach Stimulation mit potentiellen Autoantigenen der Haut im ELISpot-Assay (IFN $\gamma$ , IL-5, IL-17a)**
- **Histopathologische Bestimmung der T-Zellsubpopulationen innerhalb des Entzündungs-infiltrats läsionaler Mundschleimhautbiopsien (CD4, CD8)**

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
3-Amino-9-Ethyl-Carbazole (AEC; C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Schnelldorf
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Dimethylformamide (DMF; C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Schnelldorf
Dimethylsulfoxid (DMSO; C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS)	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Dulbecco's PBS 1x (ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> )	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund
Essigsäure (CH <sub>3</sub> COOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Schnelldorf
FACS Clean	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
FACS Flow	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
FACS Rinse	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom GmbH, Berlin
Humanes Serum (PHS)	Biochrom GmbH, Berlin
Isopropylalkohol	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Schnelldorf
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
L-Glutamin (200mM) mit Penicillin (10.000U/ml) und Streptomycin (10.000mg/ml)	PAA Laboratories, Cölbe
Lymphozyten Separationsmedium (LSM)	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Natrium Acetat (CH <sub>3</sub> COONa)	Merck KGaA, Darmstadt
Rinderalbumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund
Tween® 20	Merck KGaA, Darmstadt
Trypanblau-Lösung 0,4%	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Schnelldorf
Natrium-Acid	Merck KGaA, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30% (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt



### 3.1.2 Medien, Lösungen und Puffer

Name	Zusammensetzung
Ammonium-Chlorid-Kalium-Lyse (ACK-Lyse)	0,15 M NH <sub>4</sub> Cl, 1 mM KHCO <sub>3</sub> und 0,1 mM EDTA, pH 7,2-7,4
Einfriermedium	FCS mit 20% DMSO
ELISA Blocking-Lösung	PBS 1x mit 10% FCS
ELISA Stop-Lösung	2 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
ELISpot AEC-Stocklösung	DMF mit 1% AEC
ELISpot Blocking-Lösung	RPMI++ mit 10% PHS
ELISpot Dilution-Puffer	PBS 1x mit 10% FCS
ELISpot Coating-Puffer	PBS 1x
ELISpot Substratlösung	0,1M Acetatlösung mit 0,05% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und 3,3% ELISpot AEC-Stocklösung
ELISpot Wasch-Puffer I	PBS 1x mit Tween® 20
ELISpot Wasch-Puffer II	PBS 1x
FACS-Puffer	PBS 1x mit 1% BSA und 0,1% einer 10%Natrium-Acid-Stammlösung
Wasser	Millipore-Wasser unsteril
RPMI ++	RPMI 1640 mit 100 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin

### 3.1.3 Kommerzielle Kits für die serologische und zelluläre Diagnostik

Name	Hersteller
Human CCL5-, human CXCL10-, human IL-17a- ELISA MAX™ Deluxe-Set	Biolegend®, San Diego, USA
Human IFNγ-, human IL-5-, human IL-8- ELISA MAX™ Standard Set	Biolegend®, San Diego, USA
Human IFNγ-ELISpot	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Human IL-5-ELISpot	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Human IL-17a-ELISpot Ready-Set-Go	eBioscience®, San Diego, USA

### 3.1.4 Antikörper

#### Durchflusszytometrie

Name	Klon	Isotyp	Konjugat	Firma
CD3	UCHT1	Maus IgG1, $\kappa$	APC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CD3	UCHT1	Maus IgG1, $\kappa$	PE-Cy5	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CD4	RPA-T4	Maus IgG1, $\kappa$	APC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CD4	RPA-T4	Maus IgG1, $\kappa$	FITC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CD4	RPA-T4	Maus IgG1, $\kappa$	PE	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CD8	SK1	Maus IgG1, $\kappa$	FITC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CD25	M-A251	Maus IgG1, $\kappa$	APC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CD27	M-T271	Maus IgG1, $\kappa$	PE	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CD127	HIL-7R-M21	Maus IgG1, $\kappa$	PE	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CD137	4B4-1	Maus IgG1, $\kappa$	APC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
TCR $\alpha/\beta$	WT31	Maus IgG1, $\kappa$	FITC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
TCR $\gamma/\delta$	B1	Maus IgG1, $\kappa$	PE	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CCR4	205410	Maus IgG2B	APC	R & D Systems®, Minneapolis, USA
IgG1	G18-145	Maus IgG1, $\kappa$	APC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
IgG1	MOPC-21	Maus IgG1, $\kappa$	FITC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
IgG1	G18-145	Maus IgG1, $\kappa$	PE	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
IgG1	MOPC-21	Maus IgG1, $\kappa$	PE-Cy5	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
IgG2B	133303	Maus IgG2B	APC	R & D Systems®, Minneapolis, USA
IgG2B	27-35	Maus IgG2B	PE	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

#### Immunhistologie

Name	Hersteller
CD4	Leica Microsystems, Wetzlar
CD8	Leica Microsystems, Wetzlar

### 3.1.5 T-Zellkultur

Name	Hersteller
IL-2, 10 U/ml	Roche, Mannheim
IL-7, 10 ng/ml	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Phytohämagglutinin (PHA), 10 mg/ml	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA

### 3.1.6 Humane kutane Autoantigene

Name	Hersteller
Desmoglein1 (Dsg1)	Im laboreigenen Baculovirussystem produziert (Fania et al. 2012; Thoma-Uszynski et al. 2004)
Desmoglein3 (Dsg3)	„
BP180-NH <sub>2</sub>	„
BP180-COOH	„

### 3.1.7 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
24-, 48-Well-Kulturplatten (Nunclon™ delta)	Thermo Fischer Scientific GmbH, Schwerte
96-Well-Flachbodenplatte (Maxisorp®)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Abdeckfolie für Mikrotiterplatten (EASYseal™)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Blutentnahmeröhrchen, CPDA (Monovette®)	Sarstedt AG und CO., Nümbrecht
Combitips, steril/unsteril, 5ml	Eppendorf GmbH, Hamburg
Deckgläschen für Neubauer Zählkammern	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
Einfrierröhrchen (Cryotubes), 1,8ml	Sarstedt AG & CO., Nümbrecht
FACS-Röhrchen	Sarstedt AG & CO., Nümbrecht
Pasteurpipetten, steril	Hirschmann Laborgeräte GmbH und Co. KG, Eberstadt
Pipettenspitzen 10µl	Axygen®, Kaiserslautern
Pipettenspitzen 100/ 200/1000µl	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Polypropylen-Röhrchen (Falcon), 15/50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäß, 1,5ml	Eppendorf GmbH, Hamburg
Serologische Pipetten, 1/ 5/ 10/25ml, steril	Sarstedt AG und CO., Nümbrecht

### 3.1.8 Geräte

Name	Hersteller
Analysewaage (analytic balance 770)	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Auflicht-Mikroskop (Axiostar)	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen
Auflicht-Mikroskop (BH2-RFCA)	Olympus GmbH, Hamburg
Clean Bench HERAsafe®	Kendro Laboratory Products, Langenselbold

CO2-Inkubator (HERAcell® 150)	Heraeus Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
Durchflusszytometer (FACSCalibur™)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Einfrierbehälter (Qualifreeze)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
ELISpot Scanner (ELI.Scan)	A.EL.VIS, Hannover
Kühlzentrifuge (Megafuge® 1.0R)	Heraeus Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
Mehrkanalpipette (Finpette®)	Thermo Fischer Scientific GmbH, Schwerte
Mikroskopkamera (CC12)	Soft Imaging System, Berlin
Multipette® plus, 30-300µl	Eppendorf GmbH, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen
pH-Meter CyberScan pH 510	Eutech Instruments Europe bv, Nijkerk, Niederlande
Pipetten (Research®), 10/100/200/1000µl	Eppendorf GmbH, Hamburg
Plattenphotometer (Sunrise™-Basic)	Tecan GmbH, Göding, Österreich
Präzisionswaage (prescion balance 440-49N)	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Reinstwassersystem (Astacus)	MembraPure GmbH, Hennigsdorf
Schüttelwasserbad (GFL 1083)	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Vortex mixer IKA® Genius 3	IKA Labortechnik, Staufen

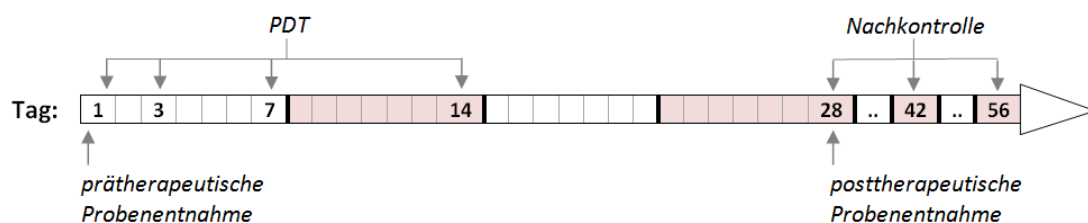
### 3.1.9 Software

Name	Hersteller
BD Cellquest Pro™ (5.2)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Eli-Analyse ELISPOT Analysis Office Software (4.2)	A.EL.VIS, Hannover
FlowJo© (7.6.3)	TreeStar Inc, Ashland, USA
GIMP (2)	<i>Freeware</i>
GraphPad Prism© (6.02)	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
ImageJ	<i>Freeware</i>
Microsoft Office (2007)	Microsoft Corporation, Redmond, USA
XFluor™ (4)	Tecan Group Ltd, Männedorf, Schweiz
Cell^D	Soft Imaging System, Berlin

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Photodynamische Therapie

Die Prinzipien der PDT wurden bereits in Kapitel 1.9 beschrieben. Die Behandlung der Patienten mit der PDT erfolgte durch die Abteilung für Parodontologie der Philipps-Universität Marburg mit dem Diodenlaser HELBO 2D Spot Probe und dem Blue Photosensitizer. Dieses System ist speziell für den Einsatz einer antimikrobiellen Therapie in der Zahnheilkunde entwickelt worden. Dabei wurde der PS zunächst lokal im Bereich der Läsion auf die trockene Schleimhaut appliziert und mindestens drei Minuten einwirken gelassen. Darauf erfolgte eine Spülung mit Natriumchloridlösung und jeweils eine mindestens 30-sekündige Bestrahlung pro Stelle mit dem HELBO 2D Spot Probe. Abschließend wurde der Läsionsbereich erneut mit Natriumchloridlösung gespült. Die Therapie erfolgte über vier Sitzungen in einem Zeitraum von 14 Tagen an Tag 1, 3, 7 und 14. Nachkontrollen wurden an Tag 28, 42 und 56 durchgeführt.



**Abbildung 3.1** Zeitlicher Ablauf der klinischen Vorgehensweise bei der PDT des OLP

Die dargestellten klinischen Maßnahmen wurden von der Abteilung für Parodontologie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

Quelle: eigene Darstellung

### 3.2.2 Patienten

Der Studie liegen Patientenproben aus verschiedenen Patientenpools zu Grunde. Diese gliedern sich in eine LP-Gruppe, bei der die Aufklärung der Ätiopathogenese im Fokus steht (Studienteil A) und in eine OLP-Gruppe, die in erster Linie der laboranalytischen Untersuchung des Wirkmechanismus und der Effektivität der PDT dienen soll (Studienteil B).

#### 3.2.2.1 Lichen planus-Patientengruppe (Studienteil A)

Die vorliegende Arbeit soll mit der Analyse dieser Patientengruppe zu den Ergebnissen der, an der Klinik für Dermatologie und Allergologie des Universitätsklinikums Marburg durchgeführten Studie „T-Zell Antworten gegen Desmogleine und Basalmembrankomponenten bei Patienten mit Lichen ruber der Haut oder der Schleimhäute“ beitragen. Die Studie wurde Ende 2013 begonnen und erste Proben bereits durch das Laborteam der Klinik für Dermatologie der Universitätsklinik Marburg analysiert, wodurch sich eine individuelle Patientenzahl für die unter-

schiedlichen Versuchsreihen der Arbeit ergibt. Die verwendeten LP-Patientenproben wurden im Zuge der genannten Studie gewonnen. Als Kontrollgruppen fungierten gesunde Kontrollen sowie Patienten mit BP.

In der vorliegenden Studie wurden 33 LP-Patienten einbezogen. Davon waren 22 weiblich und elf männlich. Der jüngste Patient war 22, der Älteste 86. Das Durchschnittsalter lag bei 57 Jahren. Die Patienten wiesen verschiedene Formen des LP, mit Manifestation an Haut und/oder Schleimhäuten, auf. Als Vergleichsgruppen wurden insgesamt 18 gesunde Kontrollen und 16 BP-Patienten herangezogen. Die Patienten der Kontrollgruppe waren zwischen 23 und 63 Jahre alt. Davon waren zehn Patienten weiblich und sechs männlich. Der Altersdurchschnitt lag bei 34 Jahren. Proben von insgesamt 16, an BP erkrankten, Patienten wurden in der Vergleichsgruppe untersucht. Sechs Patienten der BP-Vergleichsgruppe waren weiblich und zehn männlich. Der jüngste Patient war 65, der älteste 95 Jahre alt. Das Durchschnittsalter lag bei 80 Jahren.

▪ **Einschlusskriterien:**

- **LP-Gruppe:** Patienten mit LP der Haut und/oder Schleimhäute
- **K-Gruppe:** gesunde erwachsene Probanden ohne LP oder BP der Haut oder Schleimhäute
- **BP-Gruppe:** Patienten mit BP

▪ **Ausschlusskriterien:**

- **LP-Gruppe:** Systemische Immuntherapie (Prednisolon über 20 mg pro Tag, adjuvante Immunsuppression wie Azathioprin, Mycophenolatmofetil, Ciclosporin A, Cyclophosphamid)
- **BP-Gruppe:** Schwangerschaft, Alter unter 60 sowie andere Autoimmunerkrankungen

Die Probenentnahme beschränkte sich im Rahmen der Studie auf die einmalige Entnahme peripheren venösen Blutes.

Das Studiendesign wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Philipps-Universität Marburg in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki genehmigt.

**Tabelle 3.1**      **LP-Patientengruppe: Übersicht über die individuellen Patientendaten, die Verteilung der Haut- bzw. Schleimhautläsionen und die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche**

*Zusammenfassend wurden in der letzten Zeile der Tabelle die individuellen Punkte nochmals addiert und das durchschnittliche Patientenalter bestimmt. f = weiblich; m = männlich; + = Läsion vorhanden/Versuche durchgeführt*

Patientendaten			Läsionen		ELISA	ELISpot
Patient	Geschlecht	Alter	Haut	Mukosa	CXCL10, CCL5, IL8, IFN $\gamma$ , IL-5, IL- 17a	Dsg1, Dsg3, BP180-NH2, BP180-COOH
1	f	39	+	+	+	
3	m	44	+		+	
4	f	69		+	+	
5	f	60	+	+	+	
6	f	65	+		+	
8	f	86	+		+	
9	f	52	+		+	
10	f	74	+			
11	m	22	+		+	
12	m	76	+		+	
13	f	46	+	+	+	
14	m	72	+		+	
15	f	43	+	+	+	+
16	f	61	+		+	
17	m	84	+		+	
18	f	51	+		+	
19	m	51	+	+	+	
20	f	59	+		+	+
21	f	53		+	+	+
22	f	58	+	+	+	+
23	m	35	+	+	+	
24	f	52	+	+	+	+
25	f	49	+		+	
26	f	49	+		+	+
27	f	54		+	+	

28	m	63	+		+	
29	f	70	+		+	+
30	f	56	+		+	
31	m	21	+		+	
32	m	62		+	+	+
33	f	81		+	+	+
34	m	59		+	+	+
35	f	62	+			+
<b>33</b>	<b>22f/11m</b>	<b>57</b>	<b>27</b>	<b>14</b>	<b>30</b>	<b>11</b>



**Tabelle 3.2**      **Kontrollgruppe: Übersicht über die individuellen Patientendaten sowie die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche**

*Zusammenfassend wurden in der letzten Zeile der Tabelle die individuellen Punkte nochmals addiert und das durchschnittliche Patientenalter bestimmt. f = weiblich; m = männlich; + = Versuche durchgeführt*

Patientendaten			ELISA	ELISpot
Kontrolle	Geschlecht	Alter	CXCL10, CCL5, IL8, IFN $\gamma$ , IL-5, IL- 17a	Dsg1, Dsg3, BP180-NH <sub>2</sub> , BP180-COOH
1	f	27	+	
2	f	30	+	
3	f	25	+	
4	m	54	+	
5	m	28	+	
6	f	63	+	
7	f	26	+	
8	m	34	+	
9	m	34	+	
10	f	27	+	
11	f	27	+	
12	m	27	+	+
13	m	28	+	+
14	f	27	+	+
15	f	23	+	+
16	f	44	+	+
17	f	48	+	+
18	f	48	+	
<b>18</b>	<b>12f/6m</b>	<b>34</b>	<b>18</b>	<b>6</b>

**Tabelle 3.3**      **BP-Vergleichsgruppe: Übersicht über die individuellen Patientendaten sowie die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche**

*Zusammenfassend wurden in der letzten Zeile der Tabelle die individuellen Punkte nochmals addiert und das durchschnittliche Patientenalter bestimmt. f = weiblich; m = männlich; + = Versuche durchgeführt*

Patientendaten			ELISA	ELISpot
Patient	Geschlecht	Alter	CXCL10, CCL5, IL8, IFN $\gamma$ , IL-5, IL- 17a	Dsg1, Dsg3, BP180-NH <sub>2</sub> , BP180-COOH
1	m	82	+	
2	m	73	+	+
3	m	73	+	+
4	f	95	+	+
5	m	86	+	
6	f	90	+	+
7	m	88	+	
8	m	81	+	+
9	f	82	+	+
10	m	73	+	
11	m	87	+	+
12	f	77	+	+
13	f	63	+	
14	m	88	+	+
15	f	65	+	+
16	m	76	+	+
<b>16</b>	<b>6f/10m</b>	<b>80</b>	<b>16</b>	<b>11</b>

### 3.2.2.2 Patientengruppe „Oraler Lichen planus“ (Studienteil B)

Die Untersuchung der Proben dieser Patientengruppe widmet sich dem laboranalytischen Part der Studie „Effektivität und immunologischer Wirkmechanismus von photodynamischer Therapie bei der Behandlung von Patienten mit oralem Lichen Planus“, welche durch die Klinik für Dermatologie und Allergologie und die Abteilung für Parodontologie des Universitätsklinikums Marburg initiiert wurde. Die klinischen Maßnahmen und die klinische Bewertung des Behandlungserfolgs wurden durch die Abteilung für Parodontologie durchgeführt. Auch die Proben-gewinnung wurde durch die Abteilung für Parodontologie realisiert und dabei auf einen ge-meinsamen Patientenpool der beiden Abteilungen zurückgegriffen. In der vorliegenden Arbeit wurden Proben von insgesamt neun OLP-Patienten untersucht. Davon waren acht weiblich und einer männlich. Der jüngste Patient war 49 der älteste 77 Jahre alt. Das durchschnittliche Alter lag bei 62 Jahren. Aus Ermangelung einer ausreichenden Menge Probenmaterials konn-ten nicht alle Versuche mit der vollen Patientenzahl durchgeführt werden.

#### ▪ **Einschlusskriterien**

- **Erwachsene Patienten über 18 Jahre mit klinischer Diagnose eines OLP**
- **Die Läsionsgröße liegt im Durchmesser bei mindestens 10 mm**
- **Vorliegen klinischer Beschwerden** (Schmerzen, Einschränkungen der Nahrungsaufnah-me sowie der häuslichen Mundhygienemaßnahmen)

#### ▪ **Ausschlusskriterien**

- **Vorliegen einer Schwangerschaft oder Stillzeit**
- **Vorliegen einer klinisch relevanten Niereninsuffizienz, HIV-Infektionen, Hepatitis C, nicht eingestellte Herz-Kreislaferkrankungen, Herzschrittmacher**

Die Untersuchung prä- und posttherapeutisch gewonnener Proben peripheren venösen Blutes, Speichels und läsionaler Mundschleimhaut bilden die Grundlage dieses Teils der Arbeit.

Das Studiendesign wurde entsprechend auch für dieses Projekt von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Philipps-Universität Marburg in Übereinstimmung mit der De-klaration von Helsinki genehmigt.

**Tabelle 3.4**      **OLP-Patientengruppe: Übersicht über die individuellen Patientendaten sowie die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche**

*Zusammenfassend wurden in der letzten Zeile der Tabelle die individuellen Punkte nochmals addiert und das durchschnittliche Patientenalter bestimmt. f = weiblich; m = männlich; + = Versuche durchgeführt; / = Versuche bedingt durchgeführt*

Patientendaten			Durchflusszyto- metrie	ELISA	ELISpot	Immun- histologie
Patient	Geschlecht	Alter	Treg, CD8 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> , TCR, CCR4, CD27 <sup>+</sup> , CD137 <sup>+</sup>	CXCL10, CCL5, IL-8, IFN $\gamma$ , IL-5, IL-17a	Dsg3, BP180-NH <sub>2</sub>	H.E., CD4, CD8
1	f	69	/	/		+
2	f	73	/	+	+	/
3	f	72	/	+	+	+
4	f	59	+	+	/	+
5	f	49	+	+	+	/
6	f	55	+	+	+	
7	f	53	+	/	+	+
8	f	77	+	+	/	+
9	m	50	+	+	+	/
<b>9</b>	<b>8f/1m</b>	<b>62</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>8</b>

### 3.2.3 Probengewinnung und Aufbereitung

Sowohl den Patienten der LP-Gruppe als auch denen der OLP-Gruppe wurde im Rahmen der Studie peripheres venöses Blut in Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin-Röhrchen (CPDA) entnommen, welches zur durchflusszytometrischen Analyse der T-Zell Subpopulationen herangezogen wurde. Zudem wurden für weitere Versuche die zellulären Blutbestandteile vom Plasma getrennt und mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) aus der Zellsuspension isoliert.

Aus der OLP-Gruppe wurden prä- und posttherapeutische Proben gesammelt. Dabei wurde den Patienten am Tag 1 der Behandlung, vor der ersten PDT, CPDA-Blut und, nach vorheriger Lokalanästhesie, eine 5 mm große Stanzbiopsie der läsionalen Mundschleimhaut entnommen. Diese wurde vor der weiteren Verwendung zunächst in Formaldehyd gelagert und dann in Paraffin eingebettet. Weiterhin wurden Speichelproben über die sogenannte „Spuckmethode“ gewonnen (Glick und Feagans 2015). Dabei wurden die Patienten gebeten, in einem Zeitraum

von fünf Minuten, alle 60 Sekunden in ein Gefäß zu spucken. Die posttherapeutische Proben-gewinnung erfolgte analog 14 Tage nach der abgeschlossenen PDT Behandlung an Tag 28.

- **Auftrennung des Blutes in zelluläre und nicht zelluläre Bestandteile**

Mittels Zentrifugation, welche aufgrund der Massenträgheit gelöster Stoffe eine Auftrennung von Suspensionen erlaubt, wurde das CPDA-Blut in seine zellulären Bestandteile und Plasma aufgetrennt. Hierfür wurde das Vollblut für 10 min bei 20 °C und 1.300 Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute = rpm) zentrifugiert. Während das Plasma noch einmal durch Zentrifugation (10 min, bei 4 °C und 3000 rpm) aufgereinigt und dann bei -20 °C bis zur weiteren Analyse konserviert wurde, wurden PBMC aus der verbliebenen Zellsuspension isoliert. Zu den PBMC zählen neben Monozyten auch die für die weiteren Versuche benötigten T-Lymphozyten.

- **PBMC-Isolation**

Die Isolation der PBMC erfolgte nach dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation, mit dem Makromoleküle anhand ihrer Dichte, unter Zuhilfenahme eines bestimmten Lösungsmittels, durch das ein Dichtegradient aufgebaut wird, aufgetrennt werden können. Für die PBMC-Isolation wird meist das sogenannte „rate-zonal zentrifugation“-Verfahren eingesetzt. Dafür wird das Zentrifugationsröhrchen zunächst mit einer viskösen Trennlösung, wie beispielsweise dem Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer Ficoll (Dichte 1,088 g/ml) befüllt. Daraufhin wird die zu trennende Zellsuspension vorsichtig auf diese aufgeschichtet und das Röhrchen zentrifugiert. Durch die Zentrifugation lagern sich die dichteren Bestandteile, wie Erythrozyten und polymorphkernige Lymphozyten, am Boden des Röhrchens ab, während die Bestandteile geringerer Dichte, wie Monozyten und Lymphozyten, nicht in der Lage sind, durch die Trennlösung zu diffundieren und sich oberhalb der Trennlösung ansammeln.

Die hier angewandte Form der PBMC-Isolation beruht auf dem in der Klinik für Dermatologie und Allergologie bereits etablierten Versuchsprotokoll. Dafür wurde nach der Zell-/Plasmatreinnung die Zellsuspension zunächst im Verhältnis 1:1 in Phosphatgepufferter Salzlösung (Phosphat Bufferd Saline = PBS) (20 °C) gelöst und die neu entstandene Suspension im Verhältnis 1:2 auf das Lymphozytenseparationsmedium (LSM) (20 °C) geschichtet. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation (30 min bei 20 °C und 1.500 rpm, Bremsfunktion ausgeschaltet), die zu einer Auftrennung des Röhrcheninhalts in vier Schichten führt. Während sich Erythrozyten und Granulozyten nun unterhalb des LSM ablagern, finden sich die gesuchten PBMC direkt oberhalb dieser Lösung. Die vierte und oberste Schicht wird schließlich durch den verbliebenen Plasmaüberstand gebildet. Die PBMC wurden daraufhin vorsichtig mit einer Pasteurpipette aufgenommen, in ein mit 15 ml PBS (4 °C) gefülltes Zentrifugationsröhrchen

überführt und dieses bis 50 ml mit PBS (4 °C) aufgefüllt. Es folgte eine Zentrifugation (10 min bei 4 °C und 1.800 rpm). Danach wurde der Überstand verworfen und das Röhrchen erneut mit PBS befüllt. Für die weitere Aufreinigung, erfolgte eine weitere Zentrifugation (10 min bei 4 °C und 1.300 rpm). Nach der Zentrifugation wurde auch dieser Überstand verworfen und die Zellen in insgesamt 50 ml RPMI++ gepoolt. Im Anschluss erfolgte eine Quantifizierung der gewonnenen PBMC mittels Trypanblaufärbung.

#### ▪ Zellquantifizierung mittels Trypanblaufärbung

Eine Verwendung dieses anionischen Diazofarbstoffs erlaubt nicht nur eine Zellquantifizierung, sondern gleichzeitig auch eine Unterscheidung zwischen vitalen und avitalen Zellen, da lebende Zellen den Farbstoff ausschließen. Sie erscheinen in der lichtmikroskopischen Betrachtung weißlich, während avitale Zellen an ihrer dunkelblauen Färbung erkannt werden können.

Für die Quantifizierung wurden einige Mikroliter des Zellsuspendats 1:1 mit 0,4 % Trypanblaulösung gemischt. Die manuelle Auszählung erfolgte, mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer, unter dem Lichtmikroskop. Dabei wurde, über die Ermittlung einer durchschnittlichen Zellzahl im Großquadrat die Anzahl der vitalen Zellen im Zentrifugationsröhrchen mathematisch anhand der folgenden Formel bestimmt.

$$\text{Zellen/ml} = \text{Zellen pro Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

#### ▪ Kryokonservierung der Zellen

Die Kryokonservierung dient dazu, Zellen über einen langen Zeitraum haltbar zu machen. Dimethylsulfoxid (DMSO) wirkt dabei als Frostschutzmittel der Bildung von Eiskristallen entgegen.

Nach der Zellquantifizierung wurde das 50 ml-Zentrifugationsröhrchen erneut zentrifugiert (10 min bei 4 °C und 1.300 rpm) und der Überstand verworfen. Das verbliebene Zellpellet wurde in fötalem Kälberserum (FCS) aufgenommen und die Zellzahl auf  $10^7$ /ml eingestellt. Je 500 µl der gewonnen Zellsuspension wurden auf -20 °C kalte, mit 500 µl FCS mit 20 % DMSO befüllte Cryotubes verteilt und diese zunächst in einen gekühlten Isopropanol-Einfrierbehälter (4 °C) überführt. Dieser erlaubt eine schonende Temperaturreduktion. Danach erfolgte die dauerhafte Zellkonservierung bei -80 °C bzw. im flüssigen Stickstoff.

### 3.2.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein laboranalytisches Verfahren zur Identifikation und Quantifizierung einzelner Zellen innerhalb größerer Zellpopulationen, etwa anhand ihrer intrazellulär exprimierten oder auf der zelloberfläche lokalisierten Antigene. Dabei können mehrere hundert bis tausend Zellen pro Sekunde einzeln analysiert werden (Verschoor et al. 2015). Zwar

lassen sich einige Zellen bereits anhand ihrer spezifischen morphologischen Eigenschaften mit der Durchflusszytometrie analysieren, jedoch können über eine Markierung mit antigenspezifischen Antikörpern, welche mit speziellen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert sind, weitaus differenziertere Aussagen über die Zusammensetzung der Zellpopulation getroffen werden. Daher wird der Begriff „fluorescence-activated cell sorting“ (FACS) auch häufig synonym mit der Durchflusszytometrie verwendet, obwohl es sich hier eigentlich um einen Markennamen und eine spezielle Form der Durchflusszytometrie handelt. Innerhalb des Durchflusszytometers werden die Zellen per laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln an einer Laserlichtquelle vorbeigeführt und senden dabei ein spezifisches Emissionsspektrum aus, welches durch einen Detektor bestimmt werden kann. Dabei können sowohl spezifische Unterschiede der Lichtstreuung als auch der Fluoreszenz detektiert werden. Man unterscheidet eine Vorwärtsstreuung/forward scatter (FSC), welche Auskunft über die Zellgröße gibt, und eine Seitwärtsstreuung/side scatter (SSC), die die Granularität der Zellen anzeigt. Als Konjugate der spezifischen fluoreszenzkonjugierten Antikörper werden beispielsweise Fluoresceinisothiozyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC), PE-Cy5 oder Peridinin-Chlorophyll (PerCP) verwendet. Nach der Vorbereitung der Proben und der Durchführung der eigentlichen Messung schließt sich eine computergestützte Auswertung der gesammelten Daten dem Versuchsprotokoll der Durchflusszytometrie an.

Im vorliegenden Fall wurden die T-Zellen auf ihre Subpopulationen hin analysiert. Dabei wurden die Anteile an Treg (C1), CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (C2), TCRα/β- und TCRγ/δ-tragenden Zellen (C3), CCR4 tragenden sowie CD27<sup>+</sup> CD8-Zellen (T1) und durch CD137 aktivierten T-Zellen (T2) innerhalb von definierten Lymphozytenpopulationen des peripheren Blutes bestimmt. Da den TCR bei der Antigenpräsentation über MHC-Komplexe, dem Chemokinrezeptor CCR4 beim Homing der T-Zellen in der Haut und CD27 bei der dauerhaften Aufrechterhaltung der T-Zellimmunität eine entscheidende Rolle zukommt, sollen sie hier speziell untersucht werden.

#### ▪ **Antikörperfärbung**

Zunächst wurden je 100 µl der CPDA-Vollblutproben mit den spezifischen fluoreszenzkonjugierten AK für 20 min in einem lichtgeschützten Behälter auf Eis gefärbt. Dafür wurden verschiedene AK-Cocktails eingesetzt. Die verwendeten Konjugate, die Zusammensetzung der Cocktails und die Spezifität der Antikörper sind in Tabelle 3.5 dargestellt.

**Tabelle 3.5**      **Zusammensetzung der bei der Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper-cocktails**

Cocktail	FITC	PE	PE-cy5	APC
<b>C1</b>	CD4	CD127		CD25
<b>C2</b>	CD8	CD4		CD3
<b>C3</b>	TCR $\alpha/\beta$	TCR $\gamma/\delta$		CD4
<b>Ciso</b>	IgG	IgG		IgG
<b>T1</b>	CD8	CD27	CD3	CCR4
<b>T2</b>	CD8	CD4	CD3	CD137
<b>Tiso</b>		IgG2B		IgG2B

▪ **Vorbereitung der Proben mittels Ammonium-Chlorid-Kalium-Lyse-Verfahren**

Das Verfahren der ACK-Lyse dient der Lyse von Erythrozyten in Vollblutproben und erlaubt so eine Anreicherung der Leukozyten.

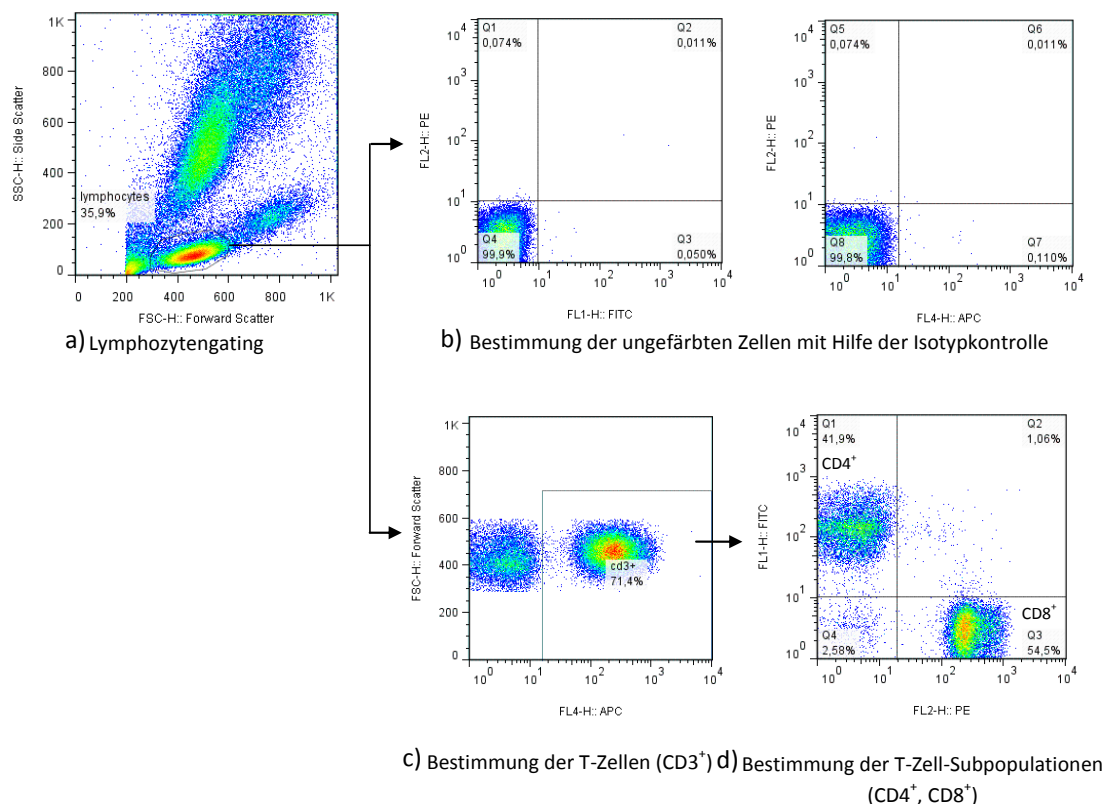
Nach der Färbung wurde das Blut zunächst mittels Vortexgerät durchmischt. Dann wurden 3 ml der ACK-Lyse zu der gefärbten Blutprobe gegeben, diese 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (5 min bei 4 °C und 1.600 rpm). Der Überstand wurde verworfen und der gesamte Vorgang einmal wiederholt. Abschließend wurden die gefärbten Zellen mit 3 ml FACS-Puffer gemischt und durch Zentrifugation (5 min bei 4 °C und 1.600 rpm) gewaschen. Auch hier wurde der Überstand dekantiert und das verbliebene Pellet in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die so gewonnene Zellsuspension wurde anschließend mithilfe des Durchflusszytometers FACSCalibur™ analysiert.

▪ **Computergestützte Auswertung der Proben**

Die gewonnen Daten wurden mit der Analyse-Software FlowJo© ausgewertet. Zunächst wurde dabei die Lymphozytenpopulation anhand der Granularität (SSC) und Zellgröße (FSC) innerhalb der Gesamtzellpopulation des peripheren Blutes identifiziert und durch ein, für jeden Cocktail individuelles, Gate markiert. Anhand ungefärbter Kontrollen wurde daraufhin der Bereich ungefärbter Zellen definiert. Zellen in diesem Bereich wurden für die folgenden Auswertungen nicht berücksichtigt. Zusätzlich wurde mit Hilfe von Isotypkontrollen eine potentielle Hintergrundfärbung in die Analyse mit einbezogen. Die weitere Auswertung erfolgte über ein isotypenbasiertes Gating für jeden Cocktail individuell. Prinzipiell wurde im folgenden Schritt zunächst cocktailspezifisch eine übergeordnete T-Zellsubpopulationsgruppe innerhalb des Lymphozytengates, anhand des FSC und des entsprechenden Konjugats identifiziert. Im Cock-

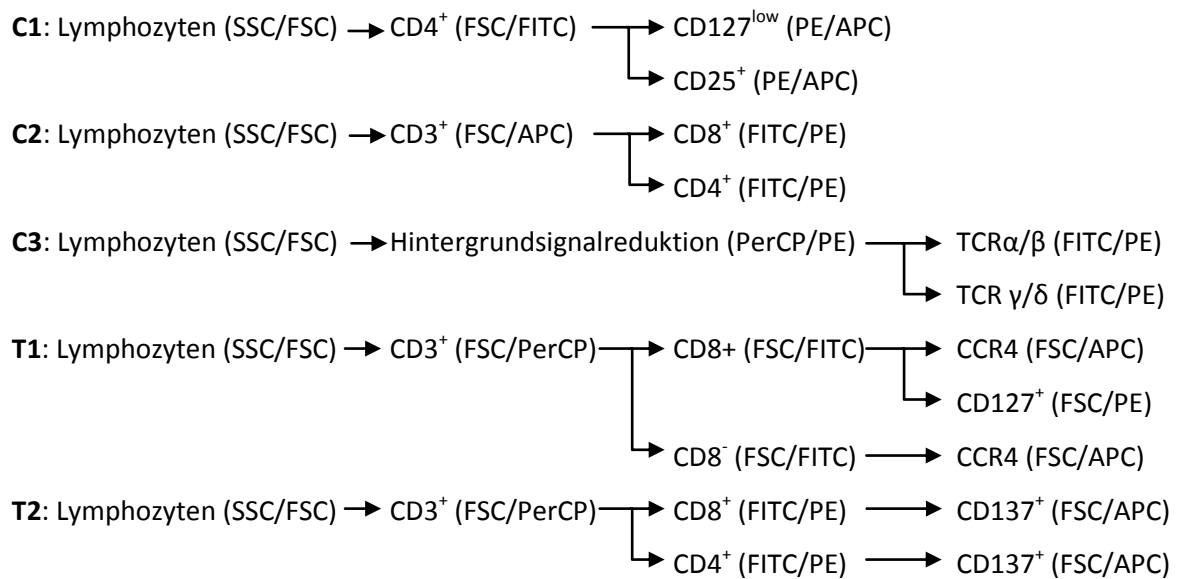


tail C2, dessen Gatingsschritte in Abbildung 3.2 beispielhaft dargestellt sind, wird diese etwa durch die T-Lymphozyten gebildet, die anhand einer CD3-Oberflächen-Markierung mit APC-konjugierten AK von anderen Lymphozyten unterschieden werden konnten. Diese übergeordneten Gruppen wurden entsprechend der Fragestellung anhand der Oberflächenmarkierungen weiter differenziert und die Anteile der gesuchten Zellen innerhalb der übergeordneten Gruppe bestimmt. Im Cocktail C2 wurde demnach der Anteil  $CD8^+$  und  $CD4^+$  innerhalb der T-Lymphozytenpopulation analysiert. Eine Besonderheit stellt das Gating in Cocktail C3 dar. Hier wurde nach dem Lymphozytengating der PerCP- gegen den PE-Kanal aufgetragen und für die weitere Analyse PerCP<sup>+</sup>-Zellen ausgeschlossen, da man davon ausgeht, dass es sich bei diesen Signalen um Autofluoreszenz handelt, weil bei der Färbung keine PerCP-konjugierten AK verwendet wurden. Dieser Schritt dient somit der Entfernung von Hintergrundsignalen.



**Abbildung 3.2** *Beispiel für die computergestützte Auswertung der durchflusssytometrischen Proben (Cocktail C2)*

*Nach der initialen Identifizierung der Lymphozytenpopulation innerhalb der gesamten Zellpopulation der Probe (a), folgt eine Bestimmung der ungefärbten Zellen (b) und die Analyse der Anteile spezifisch markierter Zellen (d) innerhalb definierter Zellpopulationen (c).*



**Abbildung 3.3** *Gatingschritte für die einzelnen Antikörper-Cocktails in der computergestützten Auswertung der durchflusszytometrischen Daten*

*Neben der Reihenfolge der Gatingschritte sind hier die verschiedenen Zellpopulationen und die Konjugate bzw. Kanäle für die Ordinaten- und Abszissenachse dargestellt.*

### 3.2.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Beim ELISA handelt es sich um ein biochemisches Standardnachweis- und Quantifizierungsverfahren für verschiedene antigene Substanzen, wie etwa Zytokine. Sowohl Plasma, Serum, als auch Zellkulturüberstände können hierbei zur Analyse herangezogen werden. Das Prinzip des ELISAs beruht auf der Visualisierung einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion via enzymatischer Farbreaktion. Ein für das gesuchte Antigen spezifischer Antikörper (Coating-AK) wird im Überschuss an eine Festphase (Mikrotiterplatte) gebunden und dadurch immobilisiert. Freie Bindungsstellen am Boden der Platte werden mit einem Blocking-Puffer gesättigt um unspezifische Bindungen zu minimieren. Im folgenden Schritt wird die zu messende Probe zugefügt, sodass das gesuchte Antigen spezifisch an den Coating-AK binden kann. Ein enzymgekoppelter zweiter Antikörper (Detection-AK) bindet spezifisch ein anderes Epitop des Antigens. Der optische Nachweis erfolgt nach Umsetzung eines Substrats durch das gekoppelte Enzym. Mittels Photometer lässt sich schließlich die Optische Dichte (OD) und anhand dieser die gesuchte Antigenkonzentration bestimmen. Das hier beschriebene und verwendete Versuchsprinzip entspricht dem eines sog. Sandwich-ELISAs, weitere Formen bilden Antikörper-ELISAs und kompetitive Immunoassays.

Die Quantifizierung der Konzentration der Chemokine CXCL10, CCL5 und IL-8/CXCL8 und Zytokine IFN $\gamma$ , IL-5 und IL-17a der Plasma- und Speichelproben erfolgte nach den Herstellerangaben der verschiedenen ELISA-Kits. Um für die Proben OD im Bereich der Standards zu gewährleisten, wurden diese teilweise mit Assay Diluent verdünnt. Vereinzelt wurden für Proben, deren OD den Standardbereich im ersten Versuchsanlauf überschritten hatte, individuell höhere Verdünnungen gewählt und der Versuch erneut durchgeführt. Bei den Standardreihen wurde, neben den Standardverdünnungen, immer eine Negativkontrolle aus reinem Medium mitgeführt. Die Standards und Proben wurden als Duplikate angelegt. Die Bestimmung der OD erfolgte mittels Plattenphotometer Sunrise™-Basic bei einer Absorption von 450nm und Kompensation von 570nm. Für die statistische Auswertung wurden jeweils zunächst die Mittelwerte der OD gebildet und davon dann die mittlere OD des Negativstandards subtrahiert. Anhand dieser Werte wurde schließlich mithilfe der Standard-OD, einer doppeltlogarithmischen Auftragung dieser und eines vierparametrischen Algorithmus zur Anpassung der Standardkurve, die Konzentration der untersuchten Chemo- und Zytokine im Probenmaterial berechnet.

**Tabelle 3.6**      **Standardbereiche und Probenverdünnungen im ELISA**

- = keine Verdünnung der Probe

	Standardbereich	Verdünnung		
		LP-Plasma	OLP-Plasma	OLP-Speichel
<b>CXCL10</b>	15.6-1,000 pg/ml	-	-	1:2
<b>CCL5</b>	7.8-500 pg/ml	1:20	1:30	1:50
<b>IL-8</b>	15.6-1,000 pg/ml	-	-	1:2
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	7.8-500 pg/ml	1:2	-	1:2
<b>IL-5</b>	3.9-250 pg/ml	1:2	-	1:2
<b>IL-17a</b>	3.9-250 pg/ml	-	-	1:2

### 3.2.6      Enzyme-linked Immunospot Assay

Der ELISpot-Assay stellt ein sehr sensitives laboranalytisches Verfahren zur Analyse der Proteinsekretion bestimmter Zellen dar. Er erlaubt, den Prinzipien des ELISAs folgend, anhand einer Antigen-Antikörper und Enzym-Substrat-Reaktion, diese Proteine in unmittelbarer Umgebung der sezernierenden Zelle visuell darzustellen. Damit kann im ELISpot-Verfahren sogar die Sekretion einzelner sezernierender Zellen visualisiert werden. Bereiche positiver Sekretion erscheinen dabei in Form von farbigen Spots am Boden der Mikrotiterplatte. Diese Spots können

daraufhin visuell oder mit computergestützten Verfahren ausgezählt werden. Somit erlaubt der ELISpot-Assay sowohl eine qualitative (Vorhandensein und Intensität einer Zellantwort), als auch eine quantitative Aussage über die Zahl der sezernierenden Zellen. Die Anwendungsgebiete des ELISpot-Assays sind mannigfaltig. So kann er beispielsweise zur Analyse der Zytokinsekretion von stimulierten Immunzellen herangezogen werden und damit Aufschluss über zelluläre Immunantworten und Zytokinprofile geben.

In der vorliegenden Arbeit wurden T-Zellen auf die Sekretion von IFN $\gamma$ , IL-5 und IL-17a, nach Stimulation mit den potentiell als Autoantigen wirkenden Substanzen Dsg1, Dsg3 und BP180 hin untersucht. Das Zytokin IFN $\gamma$  repräsentiert in diesem Sinne eine TH1-Antwort, IL-5 eine TH2-Antwort und IL-17a eine TH17-Antwort. Die durchgeführten ELISpot-Assays orientieren sich dabei an einem, von der Klinik für Dermatologie und Allergologie entwickelten, neuntägigen Versuchsprotokoll (Möbs et al. 2010). Für die LP- und OLP Patientengruppe wurde dieses der individuellen Fragestellung gemäß modifiziert. Beiden Versuchsansätzen gemein ist die Verwendung von PBMC, eine achttägige Zellkultur, eine T-Zellstimulation mit IL-2 und IL-7, der Einsatz einer Negativkontrolle ohne Zugabe von Stimulanzien, eine unspezifische Stimulation mit Phytohämagglutinin (PHA) als Positivkontrolle und eine zweimalige spezifische Antigenstimulation mit den potentiellen Autoantigenen.

#### ▪ Zellkultur und Stimulation

An Tag 1 der Zellkultur wurden die kryokonservierten PBMC im Wasserbad (37 °C) aufgetaut, in ein 50 ml-Zentrifugationsröhrchen mit RPMI++ überführt und daraufhin zentrifugiert (10 min bei 4 °C und 1300 rpm). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in RPMI++ mit 10 % humanem Serum (Pooled Human Serum = PHS) aufgenommen, wobei die Menge des Zellkulturmediums zunächst unterhalb der für die Kultur benötigten Menge lag. Erst nach Quantifizierung der Zellen (siehe auch „Zellquantifizierung mittels Trypanblaufärbung“ Kapitel 3.2.3) wurde die Zellzahl auf 1 Mio/ml durch Zugabe weiteren Mediums eingestellt. Daraufhin wurden die Zellen auf eine Zellkulturplatte überführt. Für die LP-Gruppe wurden 24-Well-Platten mit 2 ml Zellsuspension/Well verwendet. Darauf folgte die erste Zellstimulation mit 10  $\mu$ g/ml der potentiell als Autoantigen wirkenden Substanzen Dsg1, Dsg3, BP180-NH<sub>2</sub> oder BP180-COOH. Die so stimulierten Zellen wurden für 48 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. An Tag 3 erfolgte die Stimulation der T-Zellen mit IL-2 (10 U/ml) und IL-7 (10 ng/ml). Die Inkubation der Zellen wurde bis Tag 8 bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> fortgesetzt.

#### ▪ Durchführung des ELISpot-Assays

Die Durchführung des eigentlichen ELISpot-Assays orientiert sich am Protokoll des Herstellers, soll hier aber kurz im Zusammenhang mit den individuellen Modifikationen erläutert werden.

Der ELISpot-Assay wurde an Tag 7 mit dem Coaten der Mikrotiterplatten begonnen. Zunächst wurden 96-Well-Platten aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) mit Coating-AK gegen IFN $\gamma$ , IL-5 und IL-17a beschichtet. Diese wurden in sterilem PBS im Verhältnis 1:200 für IFN $\gamma$  und IL-5 und 1:250 für IL-17a gelöst. Je 100  $\mu$ l der AK-Lösung wurde pro Well aufgetragen und die Platten über Nacht bei 4 °C inkubiert. Aufgrund unterschiedlicher Entwicklungszeiten wurde für IFN $\gamma$  eine separate und für IL-5 und IL-17a eine gemeinsame Platte gewählt. An Tag 8 wurden die Coating-AK-Lösungen verworfen und die Platte einmal mit 200  $\mu$ l/Well RPMI++ mit 10 % PHS gewaschen. Der anschließende Blocking-Vorgang wurde mit 200  $\mu$ l/Well selbiger Lösung für zwei Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Währenddessen wurden die Zellen im Zellkulturwell sorgfältig resuspendiert und in ein 15ml-Zentrifugationsröhrchen überführt. Eine anschließende Spülung der Wells mit RPMI++ und Überführung dieser Flüssigkeit in das Zentrifugationsröhrchen, diente der Erhöhung der Zellausbeute. Die Zellsuspension wurde daraufhin zentrifugiert (8 min bei 4 °C und 1200 rpm) und der Überstand vorsichtig mit einer sterilen Pasteurpipette entfernt. Die Zellen wurden darauf wieder in Zellkulturmedium RPMI++ mit 10 % PHS aufgenommen. Für die LP-Gruppe wurden hier 1000  $\mu$ l und für die OLP-Gruppe 750 $\mu$ l verwendet. Die Platte wurde nach dem Blocken noch einmal mit 200  $\mu$ l/Well Blocking-Lösung gewaschen. Anschließend wurden die Stimulanzen zunächst mit doppelter Konzentration in RPMI++ gelöst und je 100  $\mu$ l/Well der Lösung als Duplikate auf die Elispotplatten aufgetragen. Dazu wurden schließlich noch je 100  $\mu$ l/Well der entsprechenden Zelllösung gegeben, sodass final eine Konzentration von 10  $\mu$ g/ml der potentiellen Antigene und PHA vorlag. Für die OLP-Versuchsreihe wurden drei PHA-Ansätze gewählt und die entsprechende Zelllösung 1:4, 1:8, 1:16 verdünnt, um eine Überentwicklung des Elispots zu vermeiden. Für die späteren Analysen wurde nach Betrachtung aller Ergebnisse die Verdünnung 1:8 herangezogen.

**Tabelle 3.7**      **Übersicht über die finale Stimulation der PBMC im ELISpot-Assay**

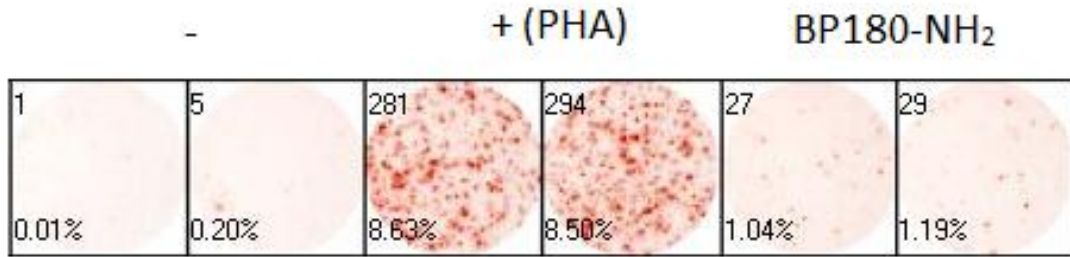
+ = Stimulation durchgeführt

	-	+ (PHA)	Dsg1	Dsg3	BP180- NH <sub>2</sub>	BP180- COOH
<b>LP</b>	+	+	+	+	+	+
<b>OLP</b>	+	+		+	+	

Die stimulierten Zellen wurden für 20h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am Tag 9 wurde die Zelllösung mittels Pasteurpipette von der ELISpot-Platte entfernt. Etwaige verbliebende Zellen wurden durch zwei Waschvorgänge mit Reinstwasser (200 µl/Well) mit einer Einwirkzeit von drei bis fünf Minuten und drei Waschschrte mit Waschpuffer I (200 µl/Well) beseitigt. Die Detection-AK wurden in Dilution-Puffer im Verhältnis 1:250 gelöst und je 100 µl/Well auf die ELISpot-Platten aufgetragen. Diese wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung verworfen und die Platten dreimal mit Wasch-Puffer I gewaschen (200 µl/Well) wobei eine Einwirkzeit von ein bis zwei Minuten beachtet wurde. Daraufhin wurden die Enzymkonjugate im Verhältnis von 1:100 für IFN $\gamma$  und IL-5 und 1:250 für IL-17a in Dilution-Puffer gelöst und 100 µl/Well auf die Platte aufgetragen. Es erfolgte eine erneute Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde. Danach wurden die Platten zweimal, mit einer Einwirkzeit von ein bis zwei Minuten, mit Wasch-Puffer I (200 µl/Well) und dreimal mit Wasch-Puffer II gewaschen. Dann wurden 100 µl/Well der frisch angesetzten Substratlösung aufgetragen. Nach vollständiger Entwicklung der Spots wurde die Substratlösung verworfen und die Platten zweimal mit Reinstasser (200 µl/Well) gewaschen. Die Platten wurden über Nacht im Dunkeln zur Trocknung gelagert.

#### ▪ Computergestützte Auswertung des ELISpot-Assays

Die Anzahl der Spots wurde mit Hilfe der Eli-Analyse ELISPOT Analysis Office Software unter Anwendung folgender Einstellungen der Analyseparameter ausgewertet. Minimum Spot Size = 2, Minimum Spot Intensity = 2; Minimum Spot Circularity = 100; Color Spot Range = 0-360; Separate Spots = 20. Etwaige falsche Spotmarkierungen, beispielsweise bei Verunreinigungen der Platte wurden manuell im Rahmen der computergestützten Auswertung entfernt. Die maximale mögliche Spotzahl wurde mit 500 Spots/Well definiert um Auswertungsungenauigkeiten bei Überentwicklung der Platten zu minimieren. Für die statistische Auswertung wurden anhand der Duplikate zunächst Mittelwerte bestimmt. Von diesen wurde die durchschnittliche Spotzahl der Negativkontrolle, die als Grundaktivität der Zelle bewertet wurde, subtrahiert.



**Abbildung 3.4 Analyse der Spotzahlen im Enzyme-linked Immunospot Assay**

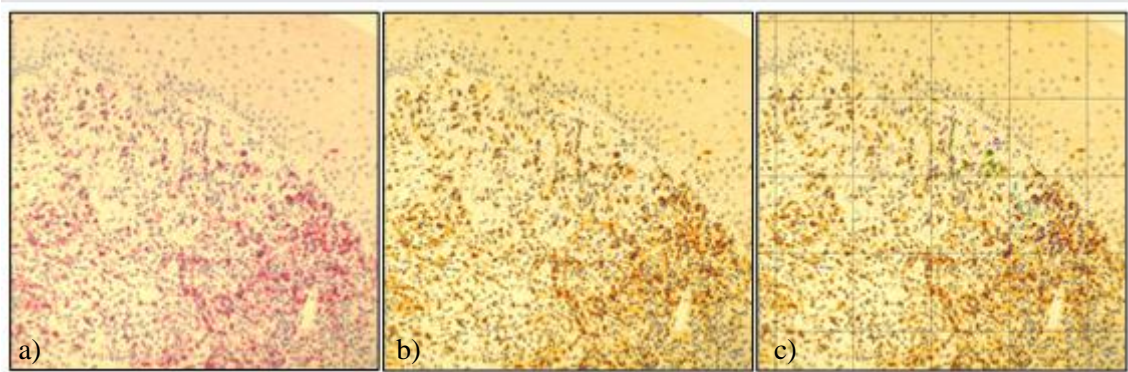
*Beispielhafte Darstellung eines entwickelten ELISpot-Assays mit Duplikaten einer Negativkontrolle (-, unstimulierte Zellen), einer Positivkontrolle (+, unspezifische PHA-Stimulation) sowie mit einer spezifischen Stimulation (BP180-NH<sub>2</sub>). Die entwickelten Spots am Boden der Mikrotiterplatten werden durch die Analysesoftware automatisch markiert und quantifiziert.*

*Quelle: eigene Aufnahme*

### 3.2.7 Histopathologie

Für die histopathologische Bestimmung der T-Zellsubpopulationen im dermalen Entzündungsinfiltrat läsionaler Mundschleimhautbiopsien der OLP-Patientengruppe wurden die prä- und posttherapeutisch gewonnenen Biopsien in der Klinik für Dermatologie und Allergologie in Paraffin eingebettet, Mikrotomschnitte angefertigt und diese gefärbt. Zur Übersicht wurde zunächst eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.) durchgeführt. Die spezifischen Färbungen wurden mithilfe spezifischer AK, die mit einem Detektionssystem gekoppelt sind, realisiert. Dieses Verfahren wird als Immunhistochemie bezeichnet. Für die Quantifizierung der T-Zellsubpopulationen im subepithelialen Entzündungsinfiltrat wurden die Schnitte zunächst mittels des Softwareprogramms Cell<sup>D</sup> mikroskopisch fotografiert (hundertfache Vergrößerung) und anschließend eine computergestützte Zellzählanalyse durchgeführt.

Dazu wurde vorab eine Bildoptimierung der Fotografien durchgeführt, um die spezifisch gefärbten Zellen bei der Auszählung besser identifizieren zu können. Hierfür wurden in dem Bildbearbeitungsprogramm GIMP 2 über die Reiter „Farben“ und „Farbton/Sättigung“ folgende Werte für den Rot-Farbbereich modifiziert. Überlagern = 50, Farbton = 30, Helligkeit = -50 und Sättigung = 0. Im Bildverarbeitungsprogramm ImageJ wurden die so optimierten Fotografien nun mit einem Raster von 50.000 x 50.000 Pixeln belegt, wobei darauf geachtet wurde, dass mindestens drei dieser Quadrate sowohl Dermis als auch Epidermis umfassten. Anschließend wurden die spezifisch gefärbten Zellen innerhalb drei dieser Quadrate markiert, die Zahl der Markierungen via ImageJ berechnet und daraus eine mittlere Zellzahl innerhalb eines Quadrates bestimmt. Neben den prä- und posttherapeutischen Veränderungen der absoluten Zellzahlen wurde zudem der Anteil spezifisch gefärbter Zellen am Gesamtinfiltrat analysiert.



**Abbildung 3.5** Beispiel für das Vorgehen bei der Quantifizierung immunhistologisch markierter Zellen im Entzündungsinfiltrat von OLP-Patienten (CD4-Färbung)

*a) Originale Fotografie der Biopsie; b) Optimierung der Bilddatei für eine bessere Identifizierung der gefärbten Zellen c) Quantifizierungsraster mit markierten Zellen.*

*Quelle: eigene Aufnahme*

### 3.2.8 Statistische Analysen

Die statistische Analyse der gewonnenen Daten erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism® (6.02). Für die grafische Darstellung wurde für die LP-Gruppe ein Streudiagramm mit Median gewählt. Für die OLP-Gruppe wurden zudem der individuelle Therapieerfolg und der Mittelwert der Patientengruppe über Balkendiagramme grafisch dargestellt. Die Ergebnisse wurden mittels des nicht parametrischen, zweiseitigen Mann-Whitney-U-Tests verglichen und auf signifikante Unterschiede hin analysiert. Dabei wurden p-Werte unter 0,05 als signifikant erachtet.



## 4 ERGEBNISSE

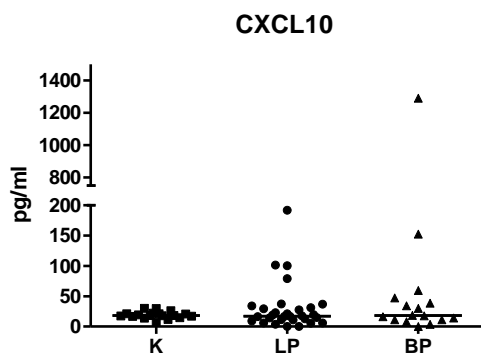
### 4.1 Studienteil A: Pathomechanismen des Lichen planus

#### 4.1.1 Bestimmung der plasmatischen Chemokin- und Zytokinlevel mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Die mittels ELISA bestimmten plasmatischen Chemo- und Zytokinkonzentrationen sollen über einen Vergleich der unterschiedlichen Patientengruppen (K = Kontrollen; LP = Lichen planus-Patienten; BP = BP-Patienten) zu einem besseren Verständnis der Pathomechanismen im LP aber auch im BP beitragen. Sowohl die Ergebnisse der LP-Patienten als auch die der BP-Patienten wurden mit denen der gesunden Kontrollen auf signifikante Unterschiede hin verglichen. Zudem wurde ein Vergleich zwischen den Ergebnissen der LP-Patienten und der BP-Patienten gezogen.

##### ▪ CXCL10

Das Chemokin CXCL10, auch bekannt als „Interferon gamma inducible protein 10“, wird von verschiedenen Zellen als Reaktion auf erhöhte IFN $\gamma$ -Level sezerniert. Es wirkt auf aktivierte T-Zellen chemotaktisch und ist somit in der Lage, diese in Entzündungsgewebe zu locken. Es spielt eine wichtige Rolle bei TH1 dominierten inflammatorischen Erkrankungen (Dufour et al. 2002). Die Analyse der Plasmalevel von CXCL10 soll neue Hinweise über seine Beteiligung am Pathomechanismus des LP liefern.



**Abbildung 4.1** CXCL10-Konzentrationen im Plasma

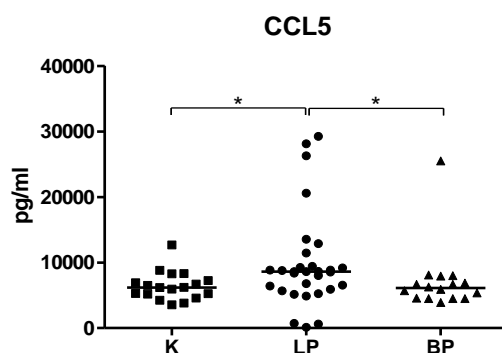
*n: K = 18, LP = 30, BP = 16; — = Median*

Bei der Analyse der CXCL10-Plasmalevel im peripheren Blut gesunder Kontrollen und an LP oder BP erkrankter Patienten ließen sich im Median keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen feststellen. Im Mittel war jedoch eine leichte Erhöhung der Plasmawerte der LP-Patienten gegenüber derer gesunder Kontrollen erkennbar. Obschon die

Plasmaproben unverdünnt aufgetragen wurden, fanden sich in allen Patientengruppen Probenkonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze des ELISA-Systems (Standardbereich 15.6-1,000 pg/ml).

#### ▪ CCL5

Das Chemokin CCL5 wirkt auf T-Zellen, Monozyten und Eosinophile chemotaktisch und kann unter anderem durch aktivierte Tc sezerniert werden. Funktionell spielt es daher eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen. Ob sich beim LP bzw. BP erhöhte Level dieses Chemokins auch im Plasma des peripheren Blutes nachweisen lassen, wurde im vorliegenden Versuch geprüft.



**Abbildung 4.2 CCL5-Konzentration im Plasma**

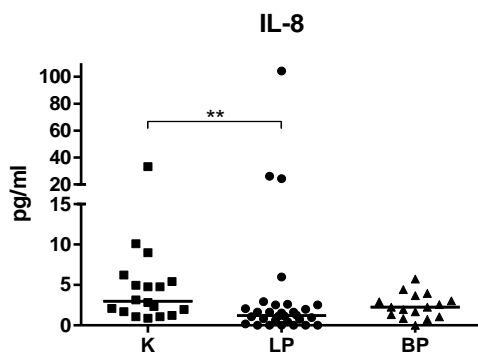
*n: K = 18, LP = 30, BP = 16; — = Median; \*  $p \leq 0,05$*

Im Vergleich der CCL5-Plasmalevel zeigt sich die LP-Patientengruppe signifikant ( $p = 0,0186$ ) erhöht gegenüber der Gruppe gesunder Kontrollen. Gleiches gilt für den Vergleich der LP-Patienten mit den BP-Patienten, auch hier findet sich eine signifikante Erhöhung ( $p = 0,0165$ ) der CCL5-Plasmalevel im Blut der LP-Patienten. Der Standardbereich für CCL5 lag bei 7.8-500 pg/ml und die ursprüngliche Verdünnung aller Plasmaproben bei 1:20. Für Proben, die diesen Standardbereich überschritten, wurde der Versuch in einer individuell höheren Verdünnung wiederholt.

#### ▪ Interleukin-8

Das Chemokin IL-8/CXCL8 ist als Entzündungsmediator verantwortlich für die rasche Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten. Diese sind im Bereich entzündeter Gewebe für die Abwehr von pathogenen Bakterien und den Abtransport von Zelltrümmern zuständig. Es wird von verschiedenen Blut- und Gewebszellen unter inflammatorischer Stimulation, z.B. durch TNF oder IL-1, produziert (Baggiolini und Clark-Lewis 1992; Lüllmann-Rauch

2009). Ob Veränderungen der plasmatischen IL-8-Konzentration das Entzündungsgeschehen beim LP bzw. BP widerspiegeln, wurde im vorliegenden Versuch geprüft.



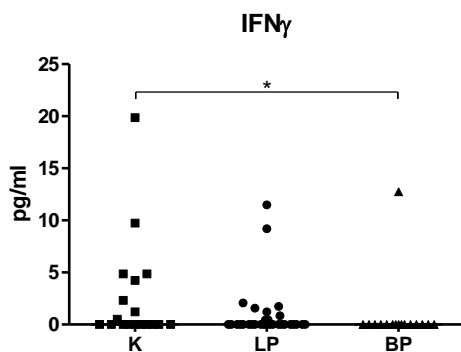
**Abbildung 4.3 IL-8-Konzentration im Plasma**

*n: K = 18, LP = 30, BP = 16; — = Median; \*\*  $p \leq 0,01$*

Im Gegensatz zur Kontroll- und BP-Gruppe waren die IL-8-Plasmalevel der LP-Patienten erniedrigt, wobei für den Vergleich zwischen LP- und Kontrollgruppe eine signifikante Verminderung ( $p = 0,0054$ ) festgestellt werden konnte. Es ist allerdings zu beachten, dass trotz der Verwendung unverdünnter Proben, die berechneten Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze des ELISA-Systems lagen (Standardbereich 15.6-1,000 pg/ml).

#### ▪ Interferon gamma

Das Zytokin IFN $\gamma$  wird durch aktivierte T-Zellen produziert und bildet das Markerzytokin einer TH1-Antwort. Funktionell ist es z.B. über die Aktivierung von Makrophagen und die Verstärkung einer MHCII-Expression an zahlreichen Immunprozessen wie etwa der Abwehr intrazellulärer Pathogene beteiligt. Inwiefern die für den LP vermutete Dominanz einer TH1-Immunantwort über die Veränderungen der plasmatischen IFN $\gamma$ -Level nachweisbar ist, wurde hier überprüft.



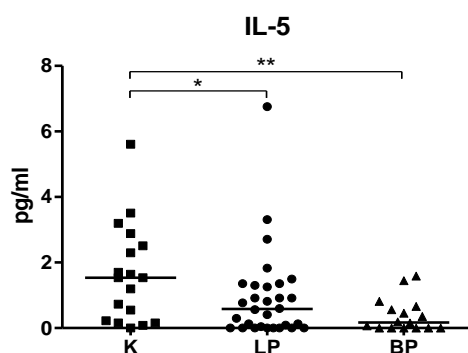
**Abbildung 4.4 IFN $\gamma$ -Konzentration im Plasma**

*n: K = 18, LP = 30, BP = 16; — = Median; \*  $p \leq 0,05$*

Bei der Analyse der plasmatischen IFN $\gamma$ -Konzentrationen konnten innerhalb aller Patientengruppen nur sehr geringe IFN $\gamma$ -Konzentrationen nachgewiesen werden. Zu einem großen Teil lagen diese unterhalb der Nachweisgrenze (Standardbereich 7.8-500 pg/ml; Verdünnung 1:2). Dennoch ergab sich eine signifikante Erniedrigung der IFN $\gamma$ -Konzentrationen der BP-Patienten gegenüber denen der Kontrollgruppe ( $p = 0,0221$ ).

#### ▪ Interleukin-5

Das Zytokin IL-5 wird von TH2-Zellen und Mastzellen produziert. Es unterstützt die Differenzierung von Eosinophilen und B-Zellen und damit die AK-Produktion. Es wurde hier als Marker für eine TH2-Antwort herangezogen.



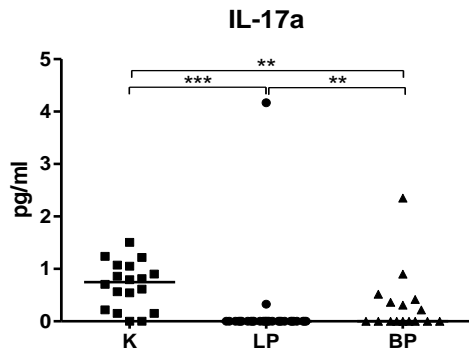
**Abbildung 4.5 IL-5-Konzentration im Plasma**

$n$ :  $K = 18$ ,  $LP = 30$ ,  $BP = 16$ ; — = Median; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$

Auch wenn die bestimmten Plasmakonzentration für IL-5 innerhalb aller Patientengruppen sehr gering ausfielen und zu einem großen Teil unterhalb des niedrigsten Standards lagen (Standardbereich 3.9-250 pg/ml; Verdünnung 1:2), lassen sich dennoch Tendenzen erkennen. So waren die Plasmakonzentrationen sowohl der LP- ( $p = 0,0301$ ) als auch der BP-Patienten ( $p = 0,0030$ ) gegenüber denen gesunder Kontrollen signifikant erniedrigt.

#### ▪ Interleukin-17a

Das proinflammatorische Zytokin IL-17a wird vor allem von TH17 Zellen sezerniert und kann als Markerzytokin für eine TH17-Antwort betrachtet werden. Ob innerhalb der LP-Gruppe erhöhte IL-17a Plasmalevel des peripheren Blutes nachweisbar sind, wurde im vorliegenden Versuch analysiert.



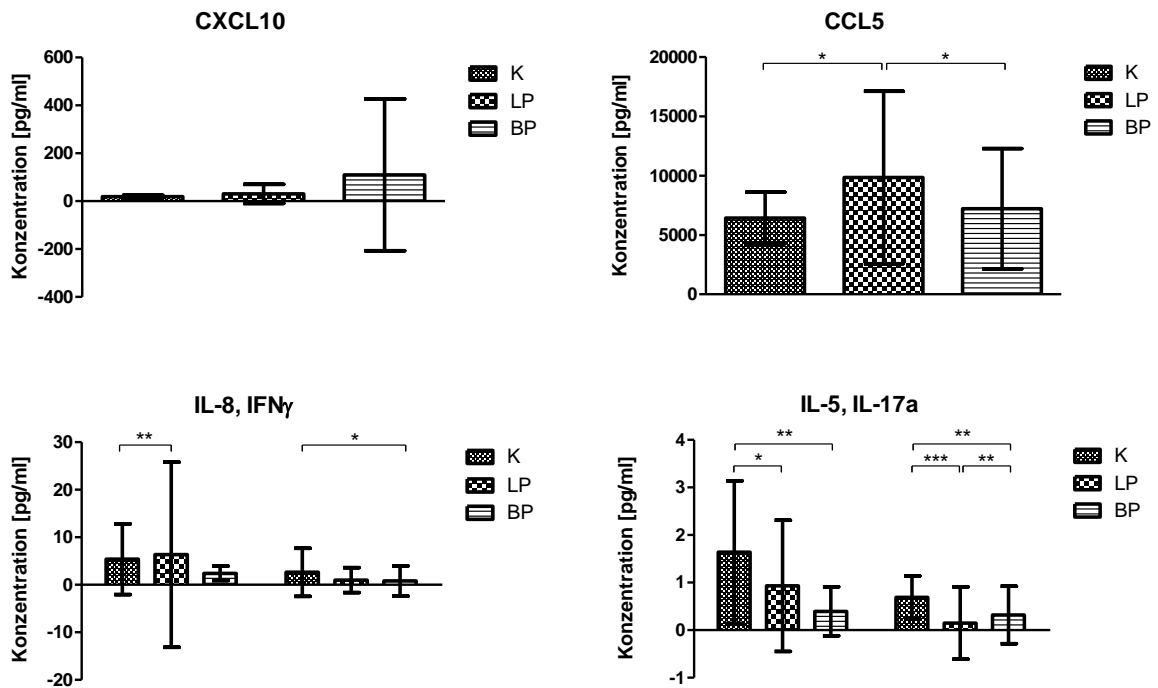
**Abbildung 4.6 IL-17a-Konzentration im Plasma**

*n: K = 18, LP = 30, BP = 16; — = Median; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$*

Auch bei der IL-17a-Plasmakonzentrationsbestimmung konnten, trotz einer Verwendung unverdünnter Proben, nur sehr geringe Konzentrationen, die meist unterhalb des niedrigsten Standards lagen (Standardbereich 3.9-250 pg/ml), ermittelt werden. Dennoch zeichneten sich Tendenzen mit signifikanten Unterschieden der Patientengruppen ab. Die IL-17a-Konzentrationen sowohl der LP- ( $p = 0.0001$ ) als auch der BP-Patienten ( $p = 0,0053$ ) zeigten sich gegenüber derer der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt. Gegenüber den LP-Patienten zeigten sich die IL-17a-Konzentrationen der BP-Patienten erhöht ( $p = 0,0040$ ).

## ▪ Übersicht der Ergebnisse der Enzyme-linked Immunosorbent Assays

Die Ergebnisse der ELISAs wurden nochmals als Mittelwerte zusammengefasst und die Standardabweichungen berechnet.



**Abbildung 4.7** Mittelwerte und Standardabweichung der ELISAs

\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

Bei dem für CXCL10 stark erhöhten Mittelwert der BP-Patienten, ist zu beachten, dass dieser sich in den stark erhöhten CXCL10-Plasmakonzentrationen eines einzelnen BP-Patienten begründet.

**Tabelle 4.1** Ergebnisse des ELISAs:  $p$ -Werte des Vergleichs der untersuchten Patientengruppen

\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

ELISA	LP-K	BP-K	LP-BP
CXCL10	0,8065	0,7958	0,5957
CCL5	0,0186*	0,9039	0,0165*
IL-8	0,0054**	0,1246	0,0851
IFN $\gamma$	0,1909	0,0221*	0,0965
IL-5	0,0301*	0,0030**	0,1861
IL-17	< 0.0001***	0,0053**	0,0040**

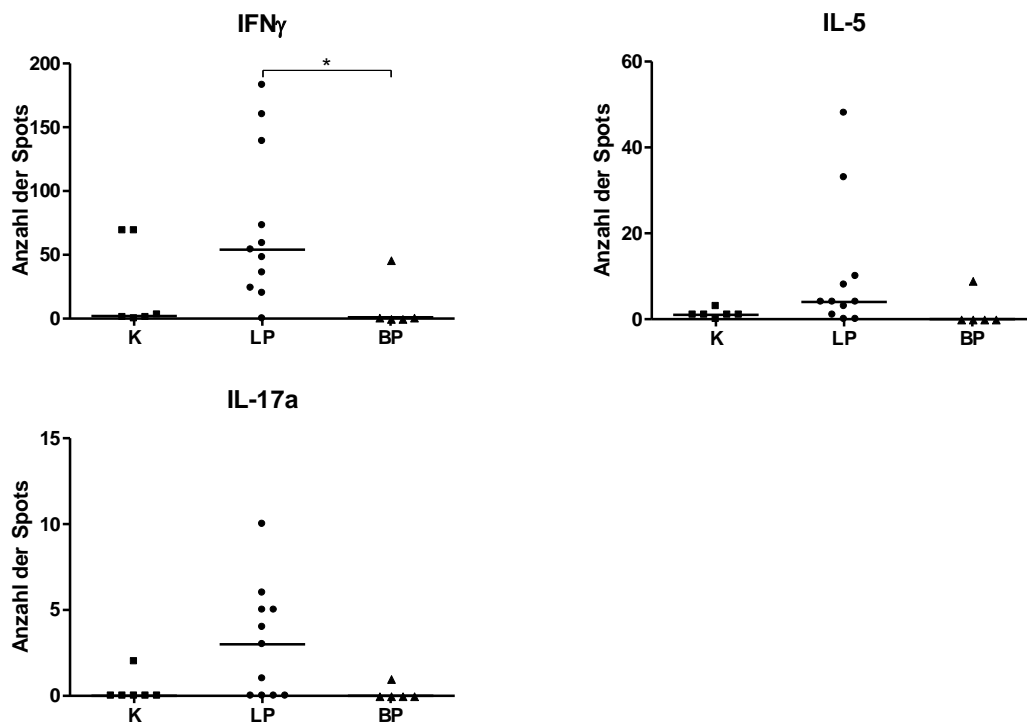
#### 4.1.2 Charakterisierung peripherer T-Zellantworten mittels Enzyme-linked Immunospot Assay

Für die Analyse der Immunantworten peripherer T-Zellen nach Stimulation mit Dsg1, Dsg3 und BP180 (BP180-NH<sub>2</sub>; BP180-COOH) wurde die Sekretion von IFN $\gamma$  als Marker für eine TH1-Antwort, IL-5 als Marker für eine TH2-Antwort und IL-17a als Marker für eine TH17-Antwort mittels ELISpot-Assay einzeln bestimmt. Daraufhin wurden die Ergebnisse der gesunden Kontrollen, LP-Patienten und BP-Patienten vergleichend analysiert.

##### 4.1.2.1 Enzyme-linked Immunospot Assay

###### ▪ Desmoglein1

Dsg1 bildet einen Bestandteil der Desmosomen. Dass Dsg1 in Autoimmunreaktionen als Antigen fungieren kann, wurde bei den Autoimmundermatosen PV und Pemphigus foliaceus nachgewiesen. Ob beim LP Dsg1-reaktive periphere T-Lymphozyten vorhanden sind, wurde mithilfe von ELISpot-Assays im vorliegenden Versuch geprüft.



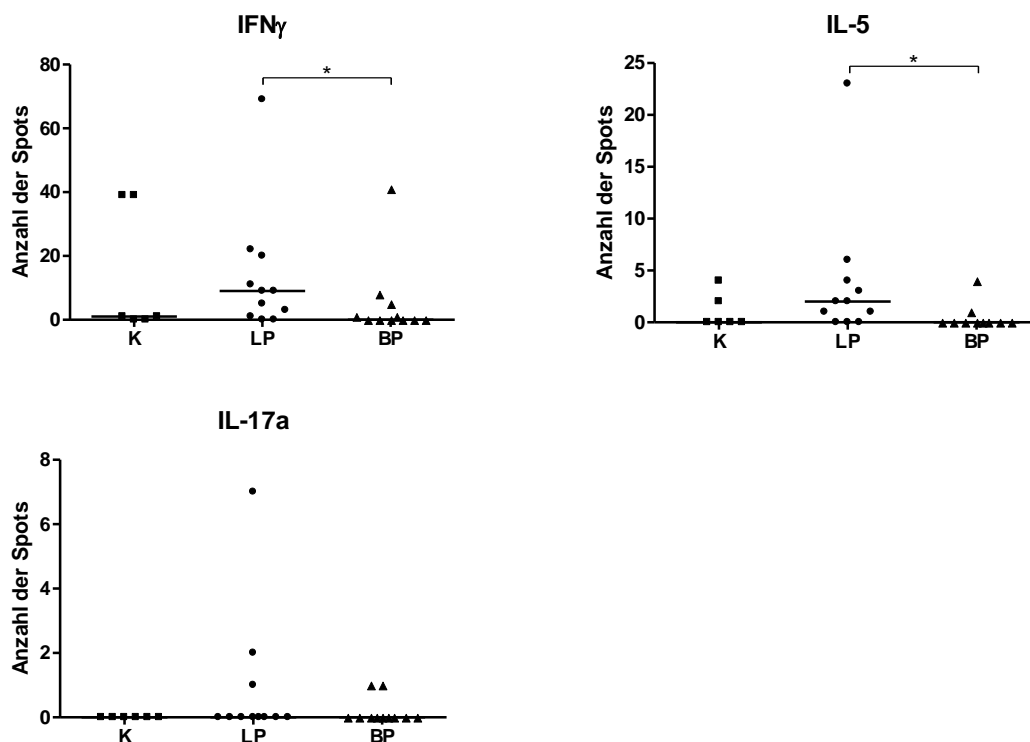
**Abbildung 4.8** Anzahl der IFN $\gamma$ -, IL-5- und IL-17a-sezernierenden T-Lymphozyten nach Stimulation mit Dsg1

*n*: IFN $\gamma$ /IL-5/IL-17a: K = 6, LP = 11, BP = 5; — = Median; \*  $p \leq 0,05$

Die Ergebnisse der einfachen ELISpot-Assays zeigten für alle Zytokine eine Erhöhung der Anzahl der sezernierenden T-Zellen auf Stimulation mit Dsg1. In der genauen Betrachtung der einzelnen Zytokine fiel auf, dass die Anzahl der Spots von IFN $\gamma$  über IL-5 zu IL-17a abnahm. Für IFN $\gamma$  konnte dabei ein signifikanter Unterschied zwischen den Spotzahlen der LP-Patienten und BP-Patienten detektiert werden (LP-BP  $p = 0,0231$ ).

#### ▪ Desmoglein3

Dsg3 stellt ebenso wie Dsg1 einen im PV als Autoantigen wirkenden Bestandteil der keratinozytären Desmosomen dar. Auch seine Wirkung auf periphere T-Zellen wurde mittels ELISpot-Verfahren bestimmt.



**Abbildung 4.9** Anzahl der IFN $\gamma$ -, IL-5- und IL-17a-sezernierenden T-Lymphozyten nach Stimulation mit Dsg3

$n$ : IFN $\gamma$ /IL-17a: K = 6, LP = 11, BP = 11

$n$ : IL-5: K = 6, LP = 11, BP = 10

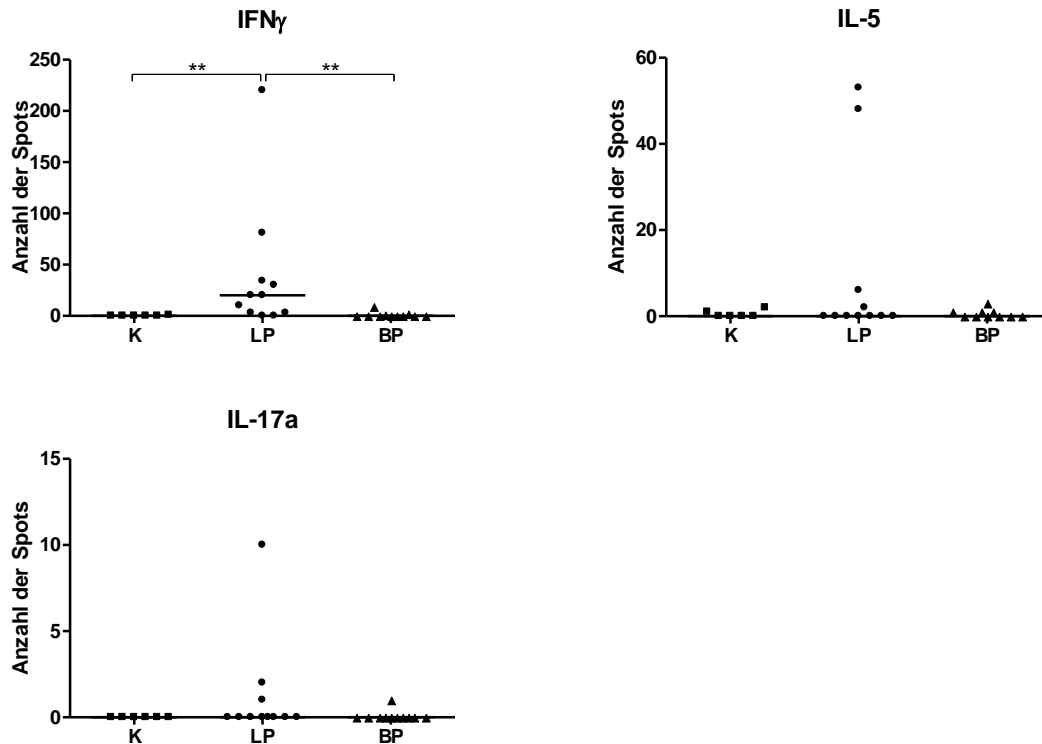
— = Median; \*  $p \leq 0,05$

Im Vergleich zu den Ergebnissen der ELISpot-Assays nach Stimulation mit Dsg1 fanden sich hier allgemein geringere Spotzahlen. Für die LP-Patienten ließ sich eine Erhöhung der Spotzahlen für IFN $\gamma$  und IL-5, nach Dsg3-Stimulation, gegenüber den Vergleichsgruppen feststellen. Diese erwies sich beim Vergleich der LP- mit den BP-Patienten als signifikant (IFN $\gamma$   $p = 0,0468$ ; IL-5  $p = 0,0222$ ).



- **BP180-NH<sub>2</sub>**

BP180-NH<sub>2</sub> bildet den N-Terminus der extrazellulären Domäne des Basalmembranbestandteils BP180 dem Autoantigen des BP.



**Abbildung 4.10** Anzahl der IFN $\gamma$ -, IL-5- und IL-17a-sezernierenden T-Lymphozyten nach Stimulation mit BP180-NH<sub>2</sub>

n: IFN $\gamma$ /IL-17a: K = 6, LP = 11, BP = 11

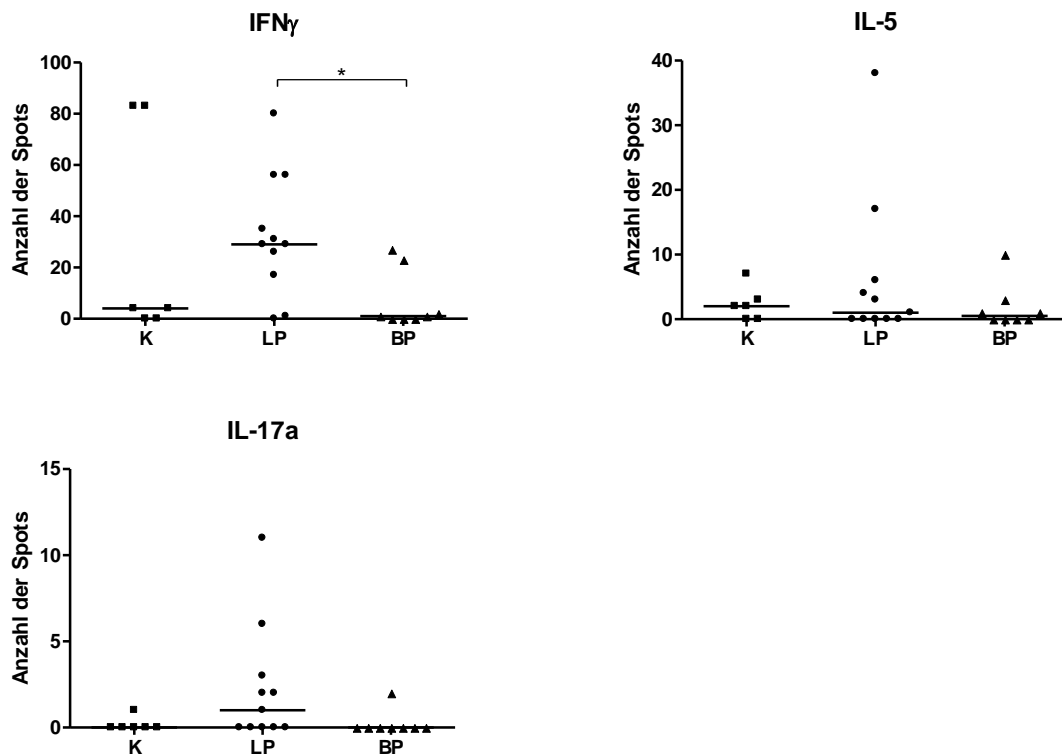
n: IL-5: K = 6, LP = 11, BP = 10

— = Median; \*\*  $p \leq 0,01$

Für IFN $\gamma$  ließ sich eine Erhöhung der Spotzahlen der LP-Patienten nach Stimulation mit BP180-NH<sub>2</sub> feststellen. Der Unterschied war dabei für beide Vergleichsgruppen signifikant (LP-K  $p = 0,0079$ ; LP-BP  $p = 0,0024$ ). Im IL-5 und IL-17a ELISpot-Assay ließen sich, bis auf wenige Ausnahmen, allgemein niedrige Spotzahlen feststellen. Besonders auffällig war dabei die geringe Reaktivität der BP-Patienten auf Stimulation mit BP180-NH<sub>2</sub>, welches das Hauptautoantigen dieser Erkrankung darstellt.

#### ▪ BP180-COOH

BP180-COOH bildet den C-Terminus der extrazellulären Domäne von BP180. Auch seine Wirkung auf periphere T-Zellen der verschiedenen Patientengruppen wurde mittels ELISpot-Assay analysiert.

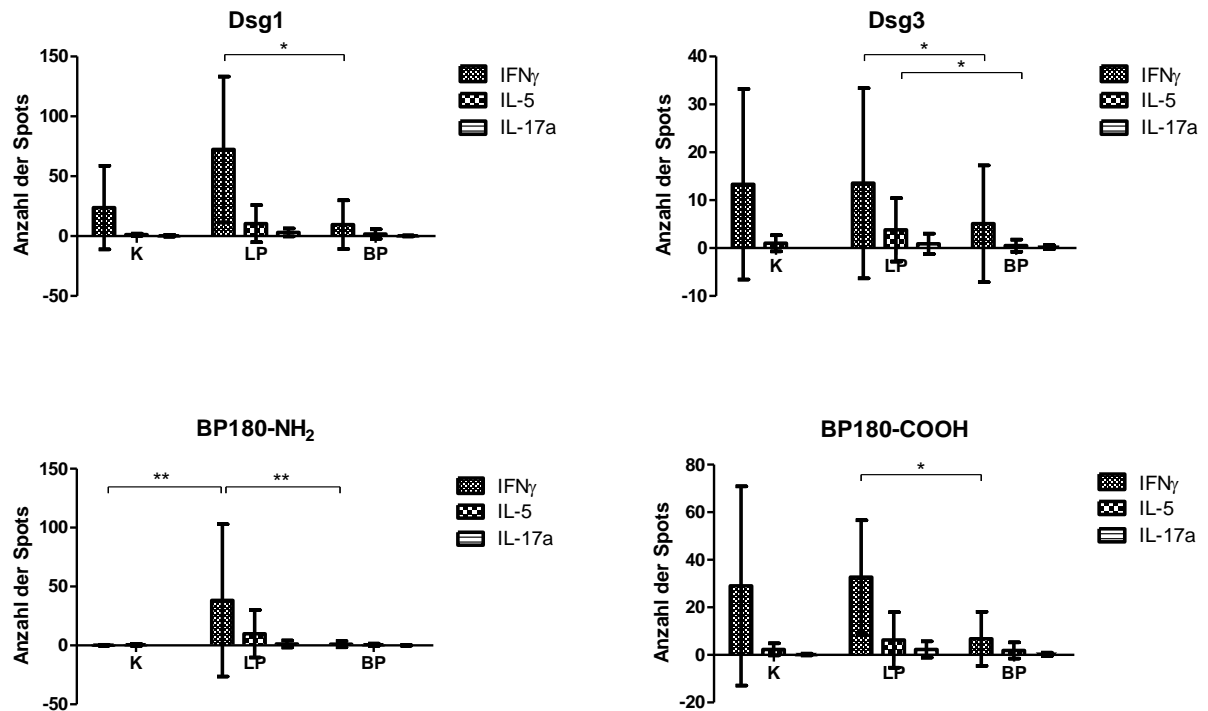


**Abbildung 4.11** Anzahl der IFN $\gamma$ -, IL-5- und IL-17a-sezernierenden T-Lymphozyten nach Stimulation mit BP180-COOH

*n: IFN $\gamma$ /IL-5/IL-17a: K = 6, LP = 11, BP = 8; — = Median; \*  $p \leq 0,05$*

Für IFN $\gamma$  zeigten sich nach Stimulation mit BP180-COOH erhöhte Spotzahlen innerhalb der LP-Gruppe. Dabei war zwischen LP und BP ein signifikanter Unterschied erkennbar ( $p = 0,0126$ ). Für IL-5 und IL-17a konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Wie auch schon bei der Stimulation mit BP180-NH<sub>2</sub> lag auch hier die Reaktion der PBMC der BP-Patienten auf Stimulation mit BP180-COOH unter den Erwartungen.

- Übersicht der Ergebnisse der Enzyme-linked Immunospot Assays



**Abbildung 4.12** Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN $\gamma$ -, IL-5 und IL-17a-ELISpot-Assays

\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$

In der Betrachtung der Mittelwerte wurde nochmals die allgemeine Abnahme der Spotzahlen von IFN $\gamma$ , über IL-5 bis zu IL-17a deutlich. Somit bilden IFN $\gamma$ -sezernierende T-Lymphozyten den Hauptanteil der untersuchten sezernierenden T-Zellen. Besonders auffällig zeigte sich in dieser Darstellung die, im Vergleich zu den gesunden Kontrollen, signifikant verstärkte Reaktion der LP-Patienten auf BP180-NH<sub>2</sub>. Weiterhin wurden hier die allgemein geringen Sekretionsraten der PBMC der BP-Patienten nochmals verdeutlicht.

**Tabelle 4.2**      **Ergebnisse des ELISpot-Assays: p-Werte des Vergleichs der untersuchten Patientengruppen**

\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; MWT n.m.= Mann-Whitney-U-Test nicht möglich

ELISpot	LP-K	BP-K	LP-BP
<b>Dsg1</b>			
IFN $\gamma$	0,1310	0,2982	0,0231*
IL-5	0,0655	0,2016	0,0801
IL-17a	0,0567	0,8923	0,0788
<b>Dsg3</b>			
IFN $\gamma$	0,5769	0,4871	0,0468*
IL-5	0,2096	0,5682	0,0222*
IL-17a	MWT n.m.	MWT n.m.	0,2615
<b>BP180-NH<sub>2</sub></b>			
IFN $\gamma$	0,0079**	0,5887	0,0024**
IL-5	0,6378	0,8998	0,7169
IL-17a	MWT n.m.	MWT n.m.	0,4679
<b>BP180-COOH</b>			
IFN $\gamma$	0,579	0,3897	0,0126*
IL-5	1	0,5007	0,5402
IL-17a	0,1022	1	0,0692

## 4.2 Studienteil B: Photodynamische Therapie des oralen Lichen planus

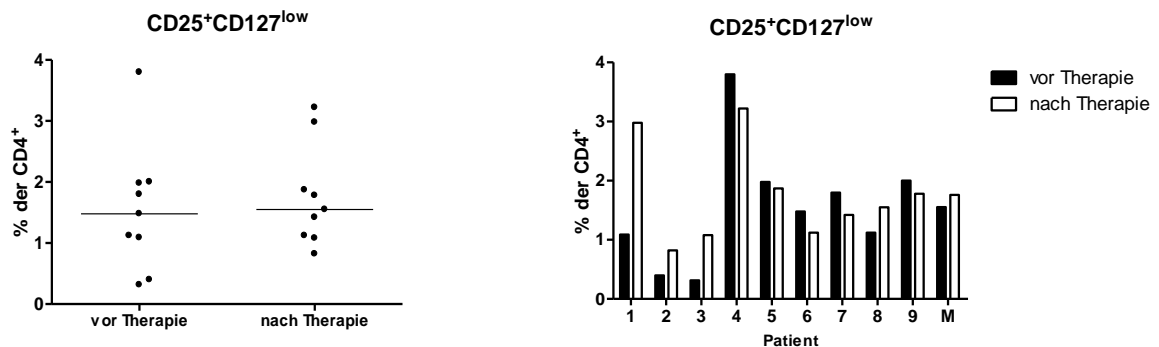
Die Ergebnisse der Untersuchungen der OLP-Gruppe sollen Aufschluss über die Wirkungsweise und Effektivität der PDT beim OLP geben. Dafür wurden die prä- und posttherapeutischen Versuchsergebnisse miteinander verglichen. Dabei wurden die Daten des Patientenkollektivs im Streudiagramm mit Median und die individuellen Patientendaten mit Mittelwert im Balkendiagramm dargestellt.

### 4.2.1 Durchflusszytometrische Analyse peripherer T-Zellsubpopulationen

Mittels Durchflusszytometrie wurde peripheres venöses Blut der OLP-Patienten auf Veränderungen verschiedener T-Zellsubpopulationen hin untersucht.

#### ▪ Regulatorische T-Zellen

Treg können anhand ihrer CD-Oberflächenantigene identifiziert werden. Sie präsentieren sich dabei als  $CD4^+$ ,  $CD25^+$  und  $CD127^{low}$ . Im vorliegenden Versuch wurde der Anteil der  $CD25^+CD127^{low}$ -Zellen an der  $CD4^+$ -Zellpopulation des peripheren Blutes bestimmt.



**Abbildung 4.13** Prozentualer Anteil der  $CD25^+CD127^{low}$ -Zellen an der  $CD4^+$ -T-Zellsubpopulation in peripheren Blut

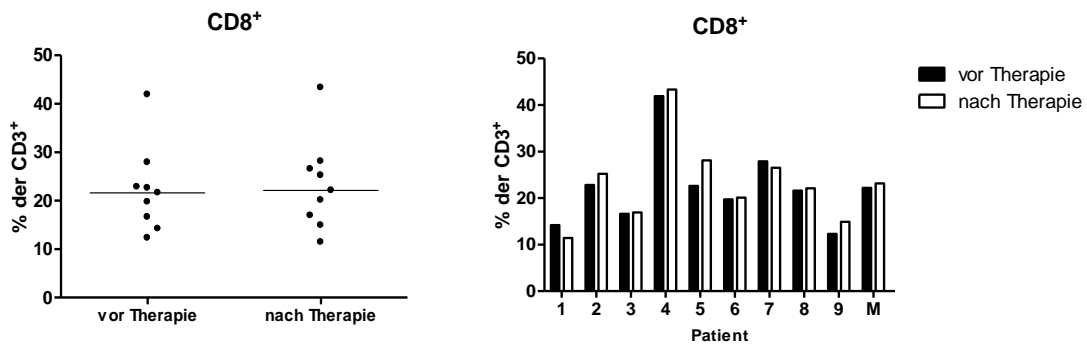
$n = 9$ ; — = Median; M = Mittelwert

Im Kollektiv konnten keine signifikanten Veränderungen in der Treg-Subpopulation nach der PDT festgestellt werden. In der Betrachtung der individuellen Patientenergebnisse zeigten sich stark variierende Ergebnisse (Zunahmen bei Patient 1, 2, 3, 8 und Abnahmen bei Patient 4, 5, 6, 7, 9) sodass sich im Mittel eine leichte nicht signifikante Erhöhung des Anteils  $CD25^+CD127^{low}$ -Zellen ergab.

#### ▪ T-Lymphozyten

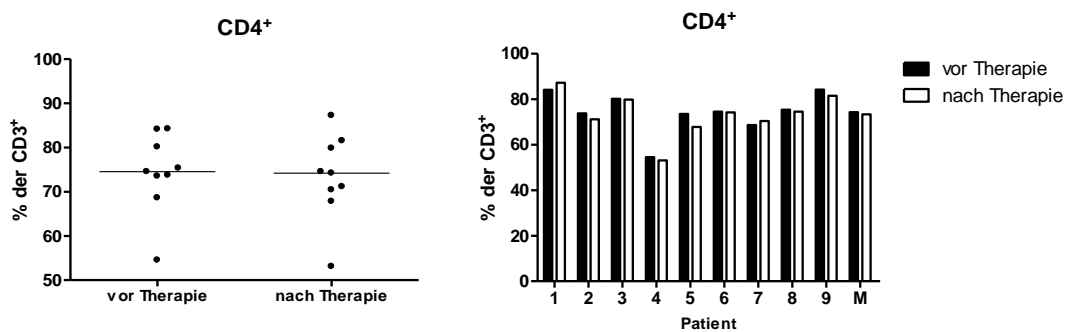
T-Lymphozyten können über das CD3-Oberflächenantigen identifiziert werden. Eine weitere Differenzierung kann über das CD8-Oberflächenantigen in Tc und über das CD4-

Oberflächenantigen in TH-Zellen erfolgen. In der Studie wurde der Anteil an  $CD8^+$ - und  $CD4^+$ -T-Lymphozyten innerhalb der  $CD3^+$ -T-Lymphozyten des peripheren Blutes bestimmt.



**Abbildung 4.14** Prozentualer Anteil der  $CD8^+$ -T-Lymphozyten innerhalb der T-Lymphozytenpopulation des peripheren Blutes

$n = 9$ ; — = Median; M = Mittelwert



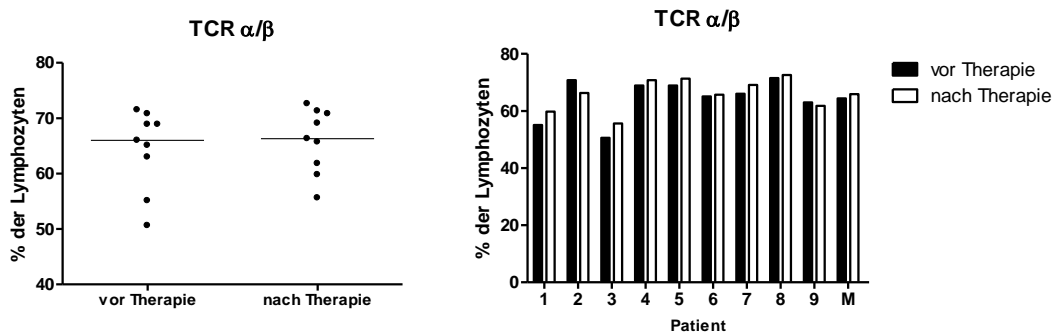
**Abbildung 4.15** Prozentualer Anteil der  $CD4^+$ -T-Lymphozyten innerhalb der T-Lymphozytenpopulation des peripheren Blutes

$n = 9$ ; — = Median; M = Mittelwert

Bei der Untersuchung der Population peripherer  $CD3^+$ -T-Lymphozyten zeigte sich, dass diese im Mittel etwa zu drei Vierteln aus  $CD4^+$ -T-Zellen und aus einem Viertel  $CD8^+$ -T-Zellen bestanden. Während in der Betrachtung des Medians keine signifikanten Veränderungen nach PDT erkennbar wurden, konnten bei den individuellen Patientenergebnissen geringfügige Veränderungstendenzen des Anteils der  $CD8^+$ - oder der  $CD4^+$ -T-Lymphozyten nach der Therapie festgestellt werden. Bei den  $CD8^+$ -T-Zellen war eine geringfügige Tendenz zur Zunahme, bei den  $CD4^+$  zur Abnahme nach erfolgter PDT erkennbar. Dabei korrelierten die individuellen Ab- und Zunahmen der jeweiligen Patienten. Demnach war eine Verschiebung des Verhältnisses der  $CD8^+$ - oder der  $CD4^+$ -T-Lymphozyten an der T-Lymphozytenpopulation nach PDT feststellbar.

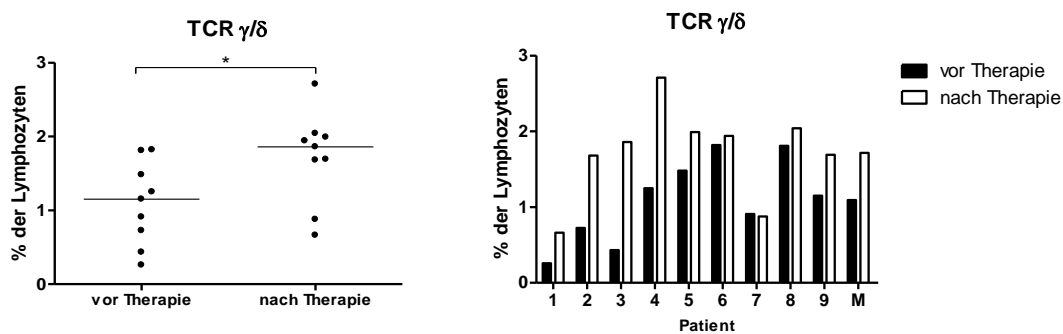
## ▪ T-Zellrezeptoren

TCR bestehen aus einem Heterodimer mit je einer hochvariablen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette und sind zusammen mit den Co-Rezeptoren CD4 und CD8 für die MHC-vermittelte Antigenerkennung und Signalübertragung von Bedeutung. Nur eine kleine Gruppe von T-Zellen, die sogenannten  $\gamma\delta$ -T-Zellen, tragen einen alternativen Rezeptor aus einer  $\gamma$ - und einer  $\delta$ -Kette. Deren genaue Funktion konnte noch nicht vollständig geklärt werden (Murphy et al. 2014).



**Abbildung 4.16** Prozentualer Anteil der  $\alpha/\beta$ -TCR<sup>+</sup> Lymphozyten innerhalb der Lymphozytenpopulation des peripheren Blutes

$n = 9$ ; — = Median; M = Mittelwert



**Abbildung 4.17** Prozentualer Anteil der  $\gamma/\delta$ -TCR<sup>+</sup> Lymphozyten innerhalb der Lymphozytenpopulation des peripheren Blutes

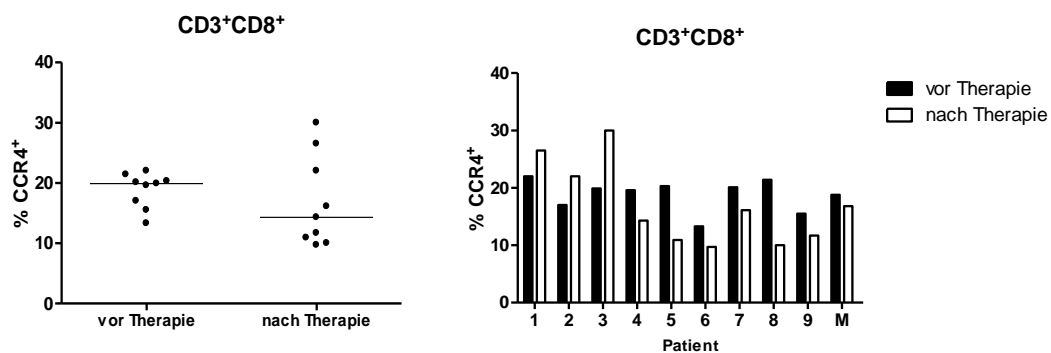
$n = 9$ ; — = Median; M = Mittelwert; \* $p \leq 0,05$

Bei der Bestimmung des Anteils der jeweiligen TCR an den Lymphozyten des peripheren Blutes zeigte sich, dass der Hauptanteil der TCR-tragenden Lymphozyten durch  $\alpha/\beta$ -TCR<sup>+</sup> Lymphozyten gebildet wird und den  $\gamma/\delta$ -TCR<sup>+</sup> Lymphozyten nur ein kleiner Anteil innerhalb der Lymphozytenpopulation zukommt. Für den Anteil  $\alpha/\beta$ -TCR<sup>+</sup> Lymphozyten konnten keine posttherapeutischen Veränderungen festgestellt werden. Individuell zeigten sich nur geringfügige posttherapeutische Veränderungen mit einer leicht zunehmenden Tendenz. Für den Anteil der  $\gamma/\delta$ -TCR<sup>+</sup> Lymphozyten zeigte sich posttherapeutisch jedoch eine signifikante Erhöhung ( $p =$

0,04). Diese ergab sich nicht nur im Median sondern wurde auch, mit Ausnahme von Patient 7, für den individuellen Therapieerfolg der einzelnen Patienten und im Mittel sichtbar.

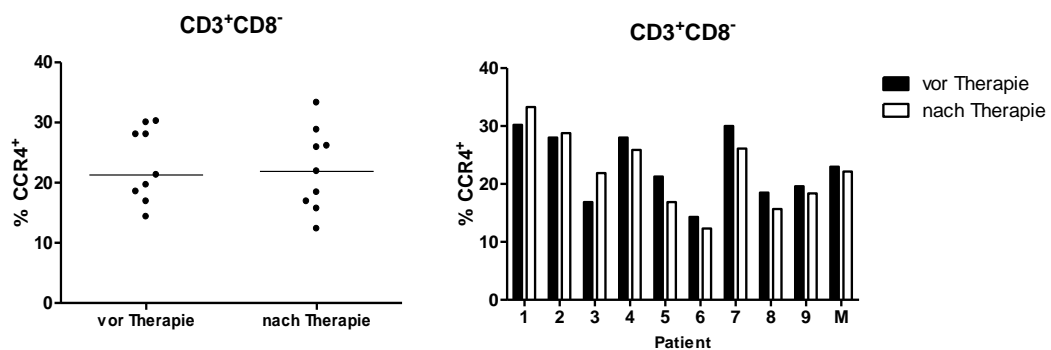
#### ▪ CCR4-tragende und CD27<sup>+</sup> Lymphozyten

Der Chemokinrezeptor CCR4 bildet einen wichtigen Faktor für die Einwanderung der Lymphozyten in die Haut. Er fungiert dabei als zentraler Homing-Rezeptor. Das zur TNF-Familie zählende CD27 liefert unter anderem über die Bindung an CD70 auf dendritischen Zellen ein starkes costimulierendes Signal zur T-Zellaktivierung (Murphy et al. 2014). Im vorliegenden Versuch wurde der Anteil CCR4<sup>+</sup>-Zellen an CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und CCR4<sup>+</sup>-Zellen an CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-T-Zellen bestimmt. Zudem wurde der Anteil der CD27<sup>+</sup>-Zellen an den CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bestimmt.



**Abbildung 4.18** Prozentualer Anteil der CCR4<sup>+</sup>-Zellen an den CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-T-Zellen des peripheren Blutes

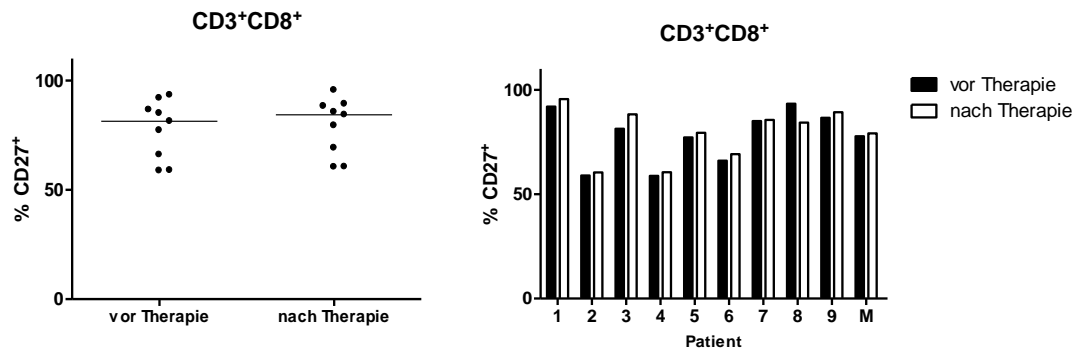
*n = 9; — = Median; M = Mittelwert*



**Abbildung 4.22** Prozentualer Anteil der CCR4<sup>+</sup>-Zellen an den CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-T-Zellen des peripheren Blutes

*n = 9; — = Median; M = Mittelwert*





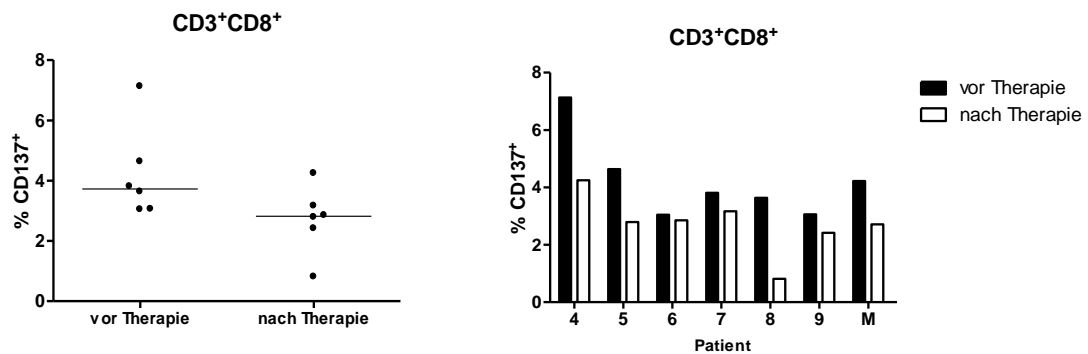
**Abbildung 4.23** Prozentualer Anteil der CD27<sup>+</sup>-Zellen an den CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-T-Zellen des peripheren Blutes

*n* = 9; — = Median; M = Mittelwert

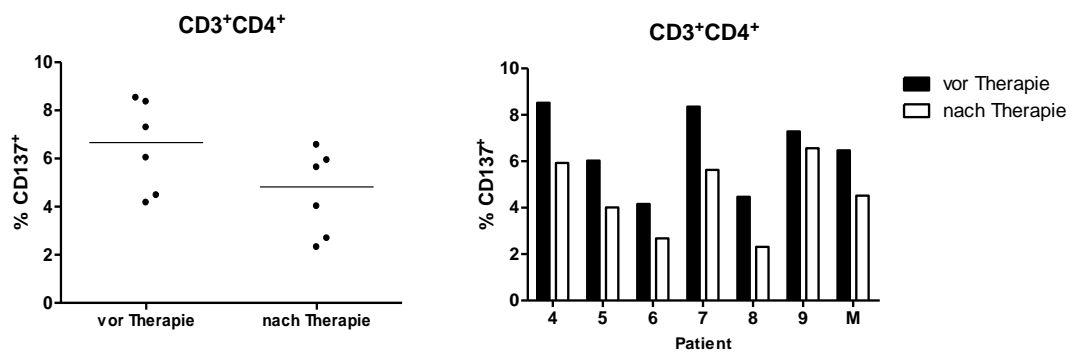
In der Ergebnisbetrachtung fand sich der Anteil der CCR4<sup>+</sup>-Zellen an den CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nach erfolgter Therapie im Median und Mittel erniedrigt, wobei jedoch die individuellen Werte von Patient 1 bis 3 das gegenteilige Ergebnis dieser Tendenz zeigten. Bei der Betrachtung der Ergebnisse des Anteils CCR4<sup>+</sup>-Zellen an den CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zeigte sich erneut eine Erhöhung der Werte für Patient 1 bis 3 und eine Erniedrigung bei den anderen Patienten. Für den Anteil der CD27<sup>+</sup>-Zellen innerhalb der CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Subpopulation ließ sich nur eine sehr schwache Tendenz zu einer posttherapeutischen Erhöhung feststellen, die jedoch bei allen Patienten außer Patient 8 erkennbar wurde. Im Median war bei allen Ergebnissen keine signifikante Veränderung nach erfolgter PDT nachweisbar.

### ▪ Aktivierte T-Zellen

Das Oberflächenantigen CD137 bildet einen Costimulator der T-Zell-Proliferation und dient als Marker für aktivierte T-Zellen (Murphy et al. 2014). In der Arbeit wurde der Anteil CD137<sup>+</sup>-Zellen innerhalb der CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>- und CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Subpopulation bestimmt.



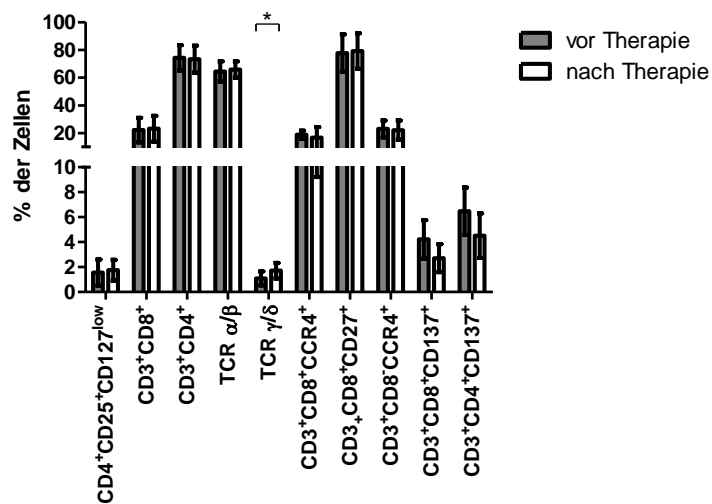
**Abbildung 4.19** Prozentualer Anteil der CD137<sup>+</sup>-Zellen an den CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen des peripheren Blutes  
*n* = 6; — = Median; M = Mittelwert



**Abbildung 4.20** Prozentualer Anteil der CD137<sup>+</sup>-Zellen an den CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen des peripheren Blutes  
*n* = 6; — = Median; M = Mittelwert

Für Patient 1 bis 3 konnte diese Färbung nicht durchgeführt werden. In der Betrachtung des Anteils der CD137<sup>+</sup>-Zellen an den CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen fiel eine durchgehende, wenn auch nicht signifikante, Erniedrigung der Werte nach PDT, sowohl für die individuellen Patienten, als auch im Median und Mittel auf. Auch für den Anteil der CD137<sup>+</sup>-Zellen an den CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen konnte eine nicht signifikante posttherapeutische Abnahme der Werte beobachtet werden.

- Übersicht der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse peripherer T-Zellsubpopulationen



**Abbildung 4.21** Mittelwerte und Standardabweichungen der durchflusszytometrischen Analyse der T-Zellsubpopulationen des peripheren Blutes

\* $p \leq 0,05$

In der Darstellung der Mittelwerte wurden noch einmal die posttherapeutischen Veränderungen der Anteile der T-Zellsubpopulationen deutlich. Es zeigte sich, dass diese spezifischen Veränderungen im Gesamten meist gering ausfielen.

**Tabelle 4.3** Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der T-Zellsubpopulationen des peripheren Blutes: p-Werte des Vergleichs der prä- und posttherapeutischen Werte

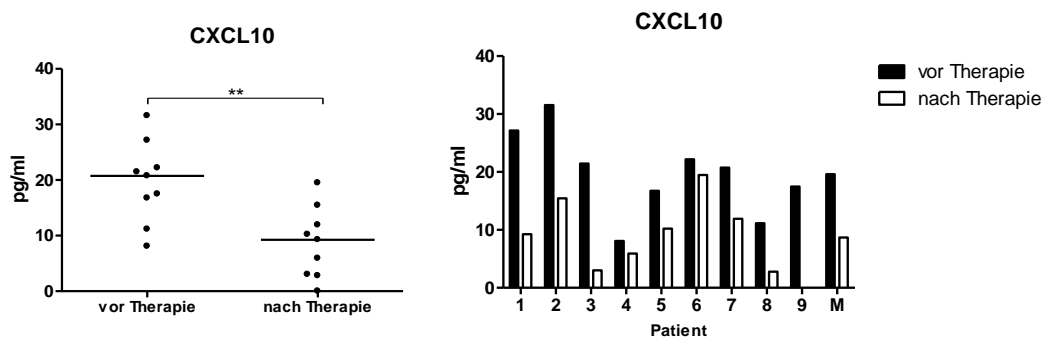
\* $p \leq 0,05$

Durchflusszytometrie	vor Therapie – nach Therapie
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>low</sup>	0,8252
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	0,7304
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	0,6910
TCR α/β	0,6269
TCR γ/δ	0,0400*
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup>	0,3536
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup>	0,7304
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup>	0,6908
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD137 <sup>+</sup>	0,0649
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD137 <sup>+</sup>	0,0931

#### 4.2.2 Bestimmung der Chemokin- und Zytokinlevel im Plasma und im Speichel mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Die Bestimmung der Chemokin- und Zytokinlevel wurde entsprechend zu den ELISAs der LP-Gruppe (siehe Kapitel 4.1.1) durchgeführt. Neben den Veränderungen der plasmatischen Chemokin- und Zytokinlevel nach PDT wurden hier zudem im analogen Verfahren prä- und posttherapeutische Speichelproben untersucht und die gewonnenen Ergebnisse verglichen.

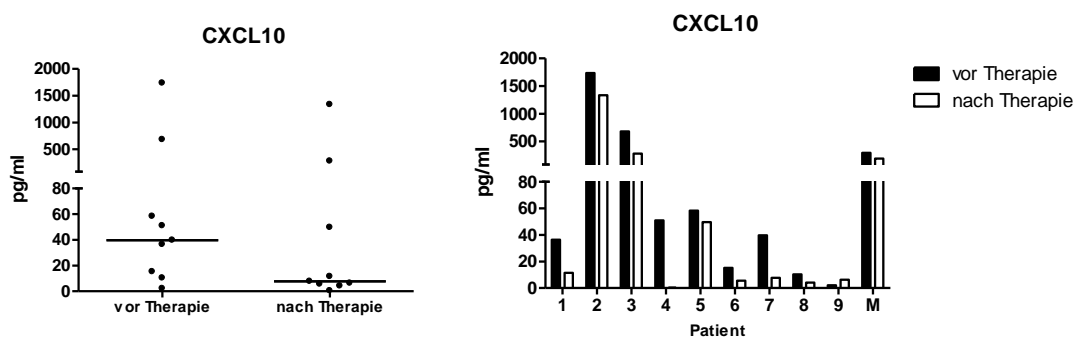
##### ▪ CXCL10



**Abbildung 4.22 CXCL10-Konzentrationen im Plasma**

$n = 9$ ; — = Median; M = Mittelwert; \*\*  $p \leq 0,01$

Für die plasmatischen CXCL10-Konzentrationen ließ sich eine signifikante Reduktion nach erfolgter PDT feststellen ( $p = 0,0056$ ). Diese wurde sowohl im Median und Mittelwert mit einer Reduktion von über 50 %, als auch für alle individuellen Patientenergebnisse sichtbar. Auch nach dem Einsatz unverdünnter Plasmaproben, lagen viele Ergebnisse unterhalb der Nachweisgrenze des ELISA-Systems (Standardbereich 15.6-1,000 pg/ml).



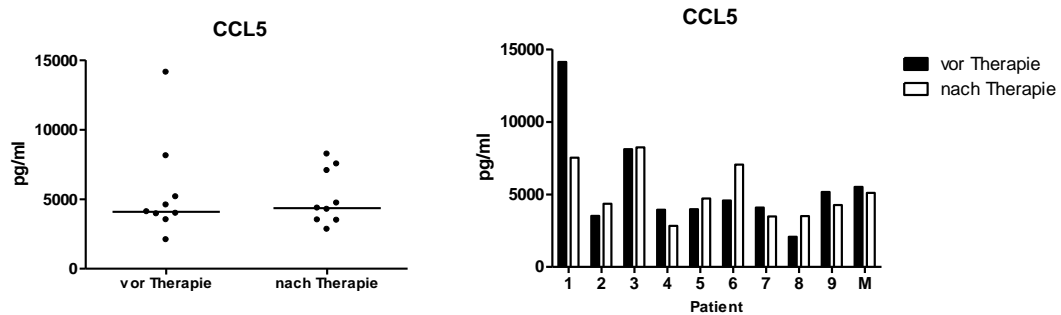
**Abbildung 4.23 CXCL10-Konzentrationen im Speichel**

$n = 9$ ; — = Median; M = Mittelwert

Im Vergleich der CXCL10-Konzentrationen von Plasma und Speichel fiel auf, dass diese beim Speichel insbesondere prätherapeutisch deutlich höher ausfielen. Auffällig war zudem eine

starke Streuung der CXCL10-Speichelkonzentrationen innerhalb des Patientenkollektivs. Dennoch ließ sich, mit Ausnahme von Patient 9, individuell eine posttherapeutische, wenn auch nicht signifikante, Reduktion der Werte erkennen. Diese Tendenz spiegelte sich auch im Median bzw. Mittelwert wider. Es wurde eine 1:2 Verdünnung eingesetzt und der Standardbereich lag bei 15.6-1,000 pg/ml.

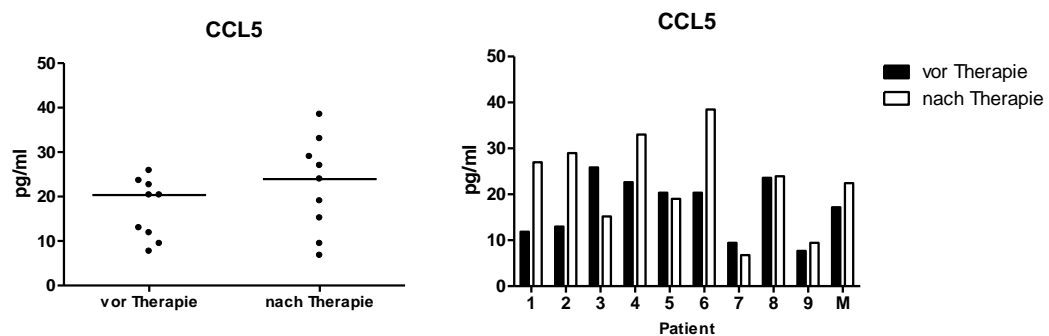
#### ▪ CCL5



**Abbildung 4.24 CCL5-Konzentrationen im Plasma**

*n = 9; — = Median; M = Mittelwert*

Posttherapeutisch zeigte sich keine signifikante Veränderung der plasmatischen CCL5-Konzentrationen im Median. Auch die individuellen Patientenergebnisse ließen keine einheitliche Tendenz erkennen. Es wurde eine Probenverdünnung von 1:30 gewählt. Der Standardbereich lag bei 7.8-500 pg/ml.



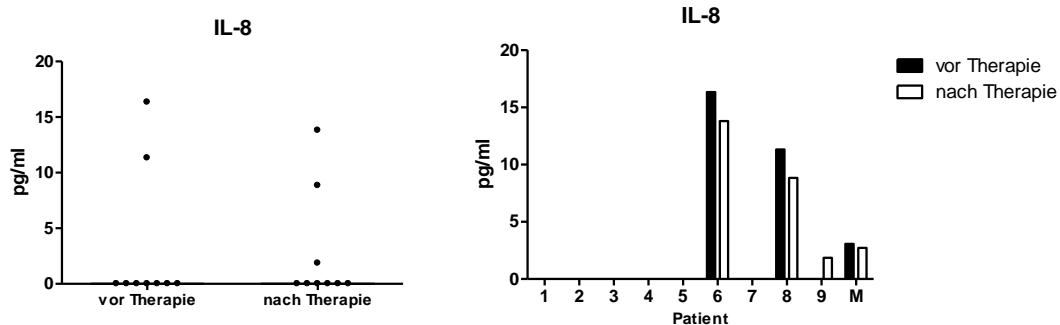
**Abbildung 4.25 CCL5-Konzentrationen im Speichel**

*n = 9; — = Median; M = Mittelwert*

Die CCL5-Konzentrationen im Speichel waren deutlich niedriger als im Plasma. Dabei ließ sich eine Tendenz Richtung posttherapeutischer Erhöhung der Werte feststellen. In Betrachtung der einzelnen Patienten fand sich diese für die Patienten 1, 2, 4, 6, 8 und 9, wohingegen

die Werte der Patienten 3, 5, und 7 nach der PDT erniedrigt waren. Die Speichelproben wurden 1:50 verdünnt und der Standardbereich lag bei 7.8-500 pg/ml.

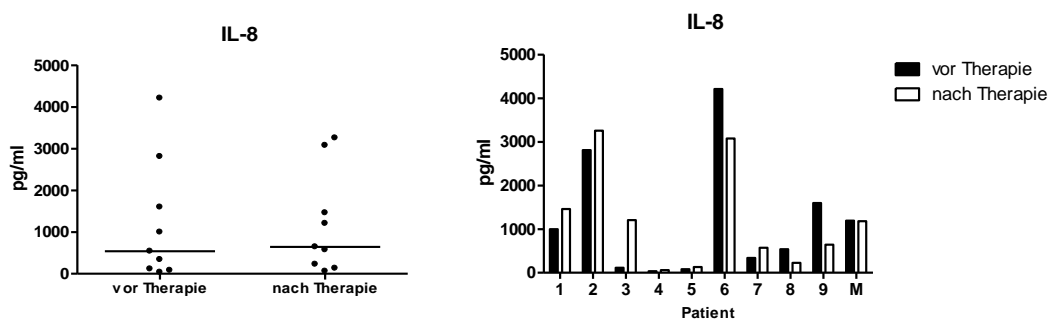
#### ▪ Interleukin-8



**Abbildung 4.26** IL-8-Konzentrationen im Plasma

$n = 9$ ; — = Median; M = Mittelwert

Für die Mehrzahl der Patienten konnte IL-8, trotz Verwendung unverdünnter Proben, nicht im Plasma nachgewiesen werden. Lediglich bei Patient 6, 8 und 9 wurden geringe Mengen dieses Zytokins detektiert. Dabei zeigten Patient 6 und 8 eine Reduktion der Werte nach PDT. Der Standardbereich lag bei 15.6-1,000 pg/ml.

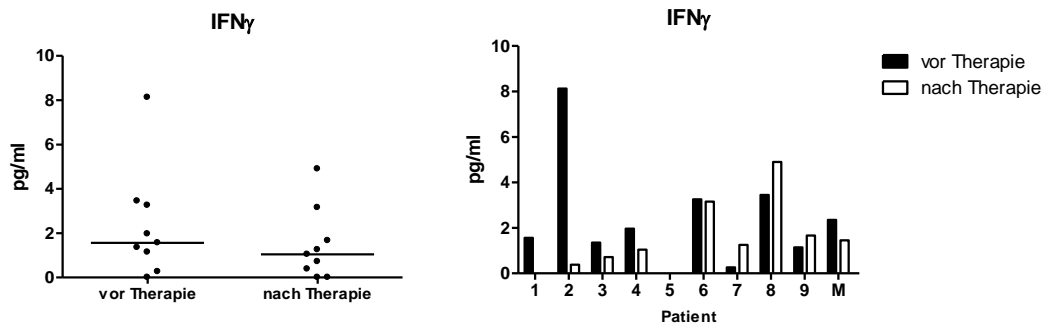


**Abbildung 4.27** IL-8-Konzentrationen im Speichel

$n = 9$ ; — = Median; M = Mittelwert

Im Speichel zeigten sich dagegen höhere IL-8 Konzentrationen, wobei diese sowohl in der Höhe der Konzentration als auch in der Art der posttherapeutischen Konzentrationsveränderung interindividuell stark variierten. Im Median ließ sich somit eine leichte Tendenz zur Erhöhung der Werte nach Therapie erkennen, wohingegen im Mittel die Werte nahezu konstant blieben. Die Verdünnung betrug 1:2 und der Standardbereich lag bei 15.6-1,000 pg/ml.

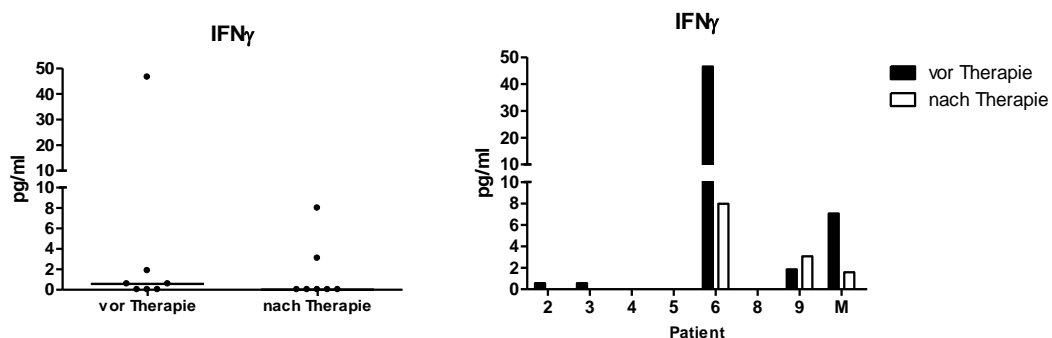
- Interferon gamma



**Abbildung 4.28 IFN $\gamma$ -Konzentrationen im Plasma**

$n = 9$ ; — = Median; M = Mittelwert

Trotz einer Verwendung unverdünnter Plasmaproben konnten für die plasmatischen IFN $\gamma$ -Konzentrationen fast ausschließlich Werte unterhalb des Standardbereichs (7.8-500 pg/ml) ermittelt werden. Dabei deuteten Median und Mittelwert eine tendenzielle posttherapeutische Abnahme der Werte an. In Betrachtung der einzelnen Patienten wurden jedoch stark unterschiedliche Ergebnisse sichtbar. Während für Patient 1-4 eine Abnahme deutlich wurde, zeigte sich für Patient 5 und 6 keine nennenswerte posttherapeutische Veränderung und für Patient 7-9 eine Zunahme der IFN $\gamma$ -Plasmakonzentrationen.

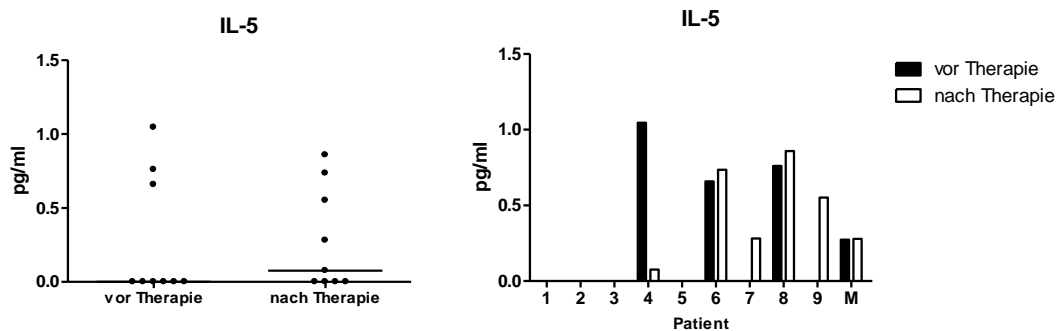


**Abbildung 4.29 IFN $\gamma$ -Konzentrationen im Speichel**

$n = 7$ ; — = Median; M = Mittelwert

Für Patient 1 und 7 wurden aufgrund von fehlendem posttherapeutischen Probenmaterial keine IFN $\gamma$ -Level im Speichel bestimmt. Ebenso wie im Plasma, konnten im Speichel nur sehr geringe Konzentrationen von IFN $\gamma$  nachgewiesen werden. Dabei lag die Verdünnung bei 1:2 und der Standardbereich bei 7.8-500 pg/ml. Auffällig waren die stark erhöhten Werte von Patient 6, die posttherapeutisch eine deutliche Reduktion zeigten. Auch im Kollektiv ließ sich tendenziell eine posttherapeutische Reduktion der IFN $\gamma$ -Speichelkonzentrationen feststellen.

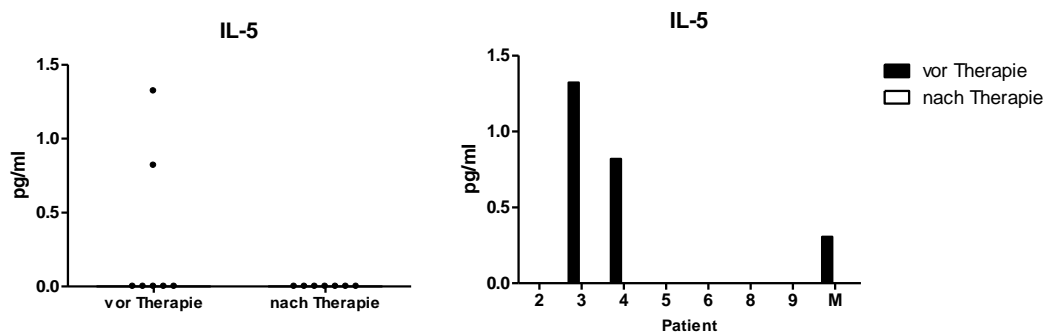
▪ Interleukin-5



**Abbildung 4.30** IL-5-Konzentrationen im Plasma

$n = 9$ ; — = Median; M = Mittelwert

Bei den Patienten konnten sowohl prä- als auch posttherapeutisch nur äußerst geringe IL-5-Level im Plasma nachgewiesen werden. Im Median war ein äußerst geringfügiger Anstieg zu erkennen. Für Patient 5-9 wurde ein posttherapeutischer Anstieg für Patient 4 eine Abnahme und für Patient 1-3 und 5 unveränderte Werte bei 0 pg/ml beobachtet. Trotz Verwendung unverdünnter Proben befanden sich alle Werte unterhalb des Standardbereichs (3.9-250 pg/ml).



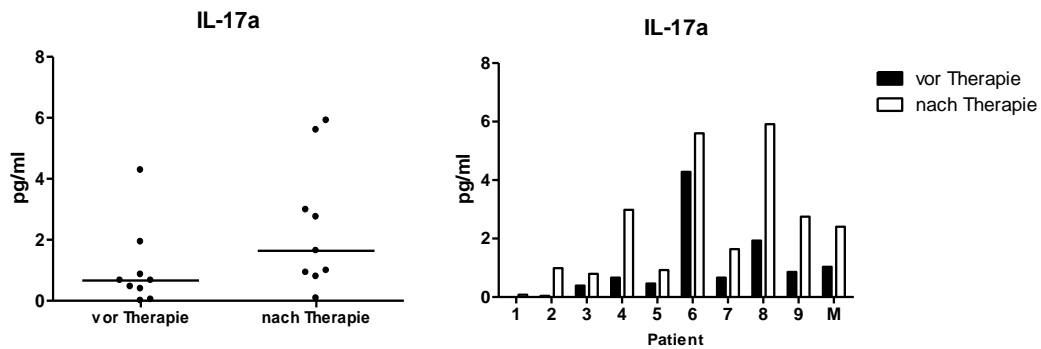
**Abbildung 4.31** IL-5-Konzentrationen im Speichel

$n = 7$ ; — = Median; M = Mittelwert

Für Patient 1 und 7 wurden aufgrund fehlenden posttherapeutischen Probenmaterials keine IL-5-Level im Speichel bestimmt. Ebenso wie im Plasma, lagen alle Werte, bei einer Verdünnung von 1:2, unterhalb des Standardbereichs von 3.9-250 pg/ml. Dabei konnten nur für Patient 3 und 4 prätherapeutisch IL-5 Konzentrationen über null nachgewiesen werden. Alle anderen Werte lagen bei Null.



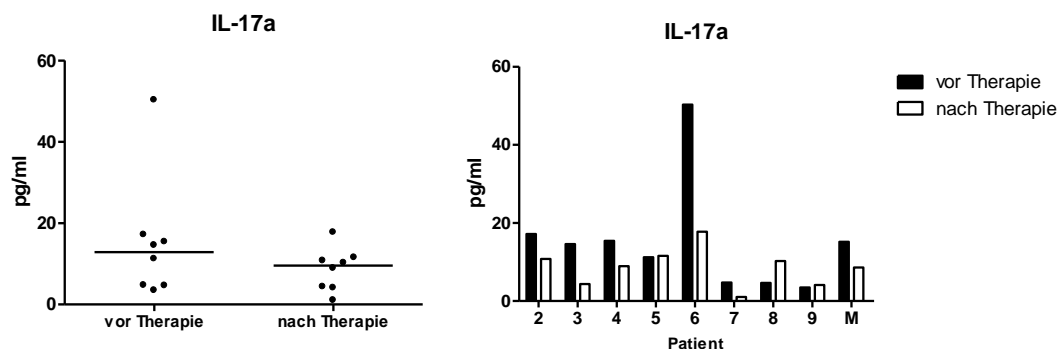
## ▪ Interleukin-17a



**Abbildung 4.32** IL-17a-Konzentrationen im Plasma

$n = 9$ ; — = Median; M = Mittelwert

Auch wenn einige Werte, trotz Verwendung unverdünnter Proben, unterhalb des Standardbereichs von 3.9-250 pg/ml lagen, ließ sich dennoch eine Tendenz für einen posttherapeutischen Anstieg der IL-17a-Level im Plasma feststellen. Diese zeigte sich sowohl im Median und Mittelwert als auch individuell bei allen Patienten.

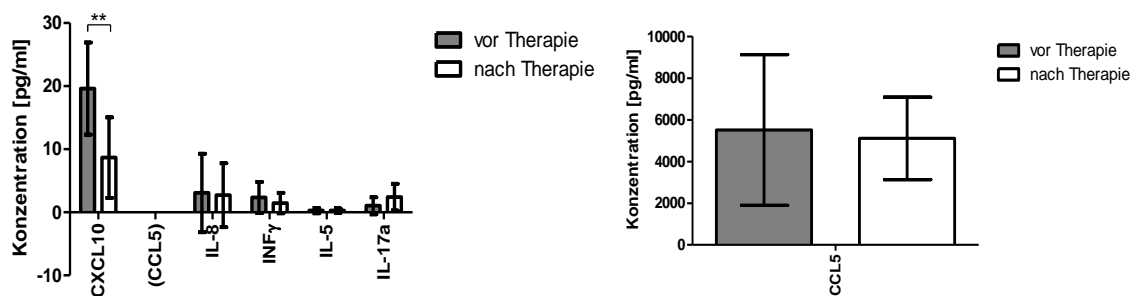


**Abbildung 4.33** IL-17a-Konzentrationen im Speichel

$n = 8$ ; — = Median; M = Mittelwert

Für Patient 1 wurde der Versuch aus Ermangelung an Probenmaterial nicht durchgeführt. Im Vergleich zu den plasmatischen IL-17a-Werten konnten im Speichel höhere Konzentrationen an IL-17a nachgewiesen werden. Im Median und Mittel zeigte sich dabei eine Abnahme der Werte nach erfolgter PDT. In der Betrachtung der individuellen Patientenergebnisse fanden sich diese auch bei Patient 2-4, 6 und 7 wieder. Für Patient 5, 8 und 9 wurde dagegen eine posttherapeutische Abnahme der Werte beobachtet. Die Verdünnung betrug 1:2 und der Standardbereich lag bei 3.9-250 pg/ml.

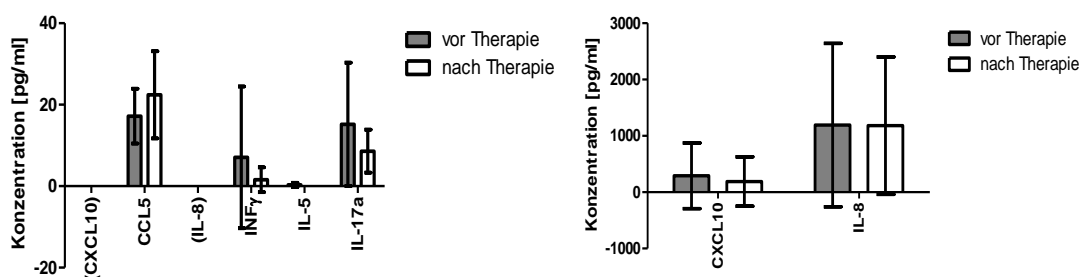
▪ **Übersicht der Ergebnisse der Enzyme-linked Immunosorbent Assays**



**Abbildung 4.34** Mittelwerte und Standardabweichungen der ELISAs unter Verwendung von Plasmaproben

\*\*  $p \leq 0,01$

Die Mittelwertübersicht machte noch einmal deutlich, dass sich die Chemokin- und Zytokinlevel mit Ausnahme von CXCL10 nach Therapie im Mittel nur geringfügig änderten.



**Abbildung 4.35** Mittelwerte und Standardabweichungen der ELISAs unter Verwendung von Speichelproben

Im Vergleich zum Plasma waren die Chemokin- und Zytokinlevel im Speichel von stärkeren, jedoch nicht signifikanten, posttherapeutischen Veränderungen betroffen.

**Tabelle 4.4** *p*-Werte des Vergleichs der prä- und posttherapeutischen Chemokin- und Zytokinlevel im Plasma und im Speichel

\*\*  $p \leq 0,01$ ; MWT n.m.= Mann-Whitney-U-Test nicht möglich

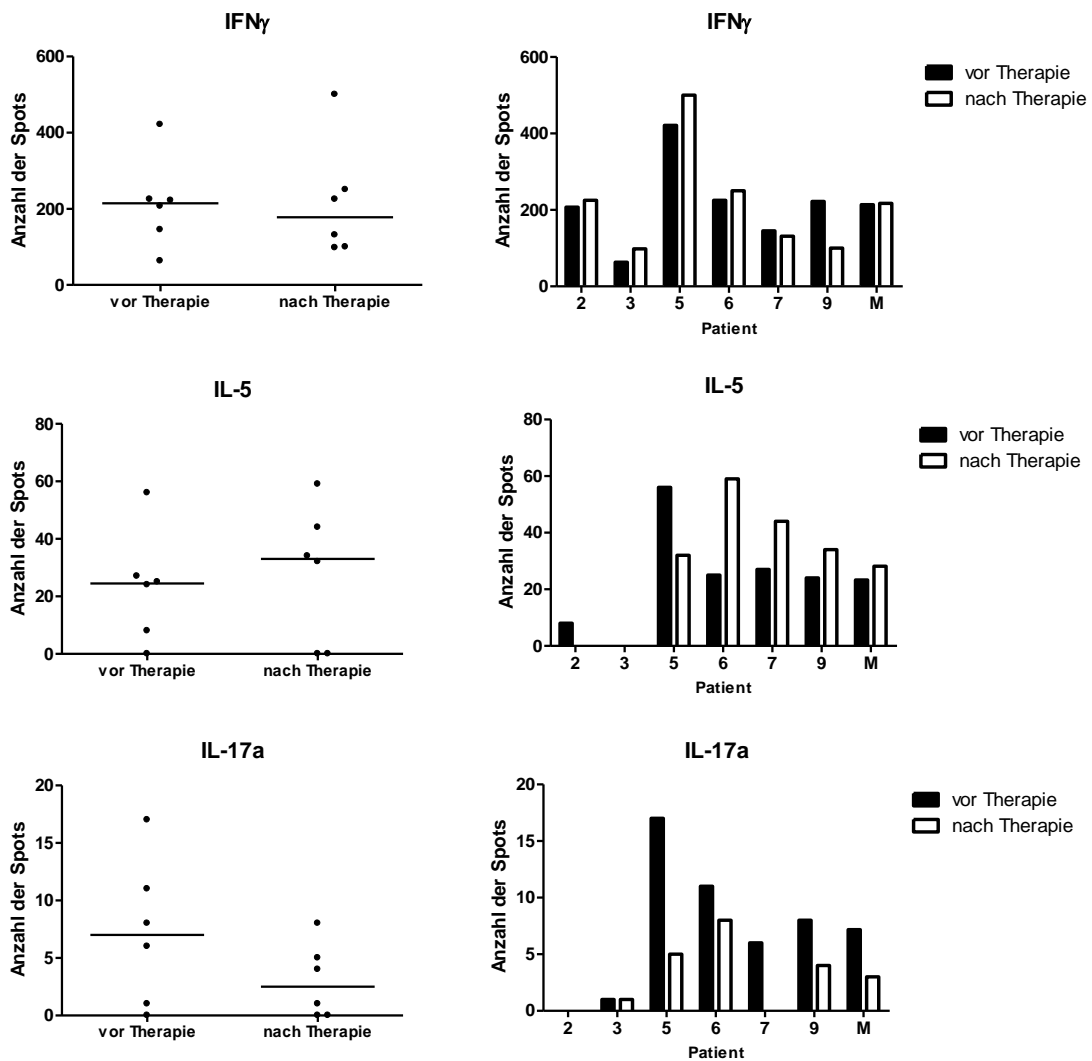
ELISA	vor Therapie – nach Therapie	
	Plasma	Speichel
CXCL10	0,0056**	0,2224
CCL5	1	0,2692
IL-8	0,8231	0,7304
IFNγ	0,3304	0,5237
IL-5	0,6982	MWT n.m.
IL-17a	0,0519	0,3282

#### **4.2.3 Charakterisierung peripherer T-Zellantworten mittels Enzyme-linked Immunospot Assay**

Mittels ELISpot-Assay wurden die prä- und posttherapeutischen T-Zellantworten nach Stimulation mit PHA, Dsg3 und BP180-NH<sub>2</sub> analysiert. Dabei wurde eine initiale Zellzahl von 750.000 Zellen/ml gewählt. Die Ergebnisse sollen im Folgenden dargestellt werden. Für Patient 1 konnten aus Ermangelung an Probenmaterial keine ELISpot-Versuche durchgeführt werden.

- **Phytohämagglutinin**

Bei PHA, genauer PHA-L, handelt es sich um ein aus Pflanzen gewonnenes Lectin, das als polyklonales Mitogen in der biochemischen Forschung zur Stimulation von T-Zellen eingesetzt wird. Es dient dabei als Mitosetrigger und damit der Proliferation von T-Zellen (Murphy et al. 2014). Dabei geht die erhöhte Mitoserate auch mit einer vermehrten Produktion von Zellbausteinen und Zytokinen einher. Anhand dieser unspezifischen Stimulation soll der Einfluss der PDT auf IFN $\gamma$ -, IL-5- und IL-17a-produzierende Zellen überprüft werden.



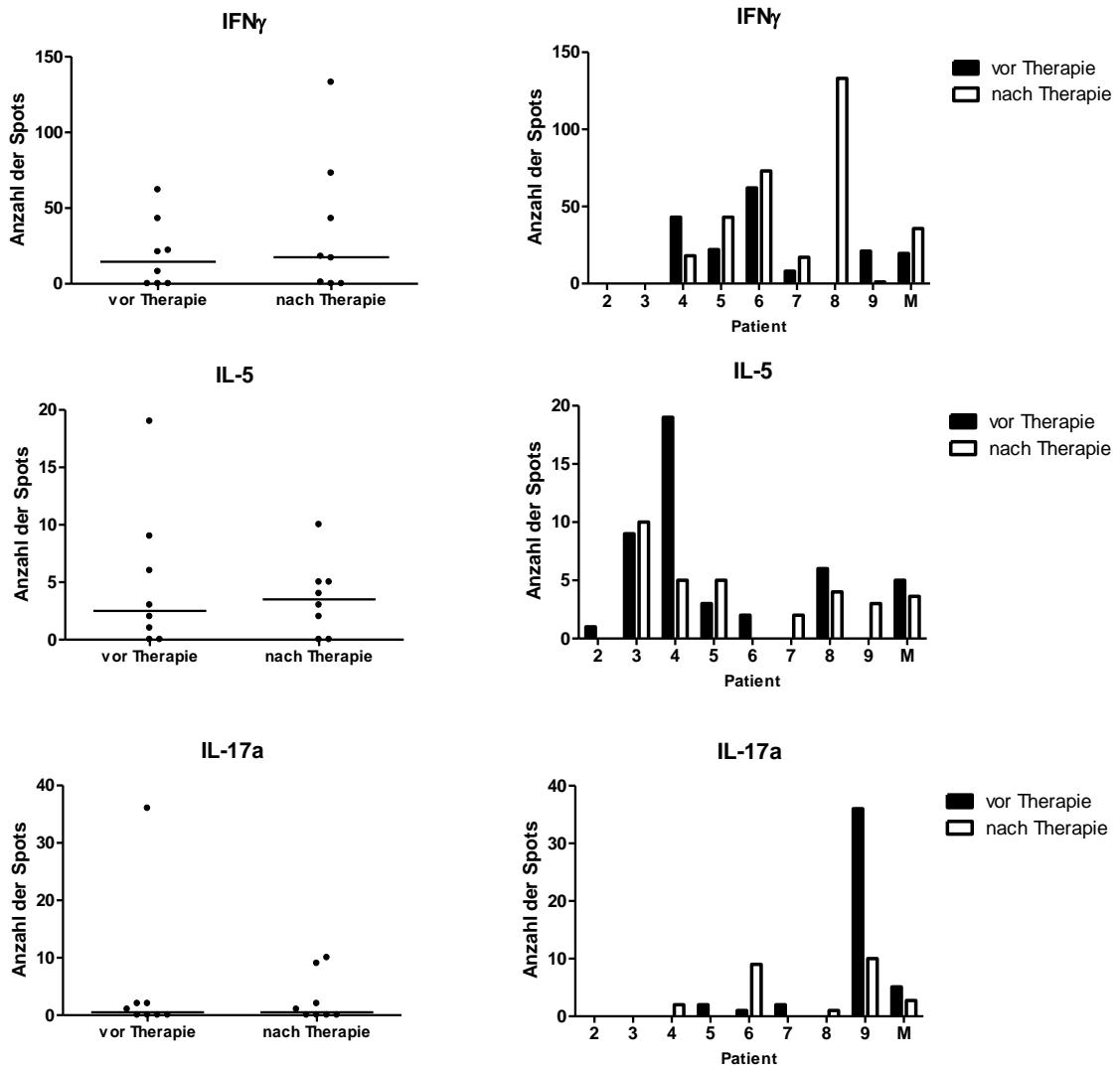
**Abbildung 4.36** Anzahl der IFN $\gamma$ -, IL-5- und IL-17a-sezernierenden T-Lymphozyten nach Stimulation mit PHA

$n = 6$ ; — = Median; M = Mittelwert

Für Patient 1, 4 und 8 wurde der Versuch nicht durchgeführt. Im Median erschien die Anzahl der IFN $\gamma$ -postiven Spots posttherapeutisch geringfügig erniedrigt. In der Betrachtung der individuellen Patientenergebnisse zeigte sich ein heterogenes Reaktionsprofil mit posttherapeutischen Zunahmen bei Patient 2, 3, 5 und 6 sowie Abnahmen bei Patient 7 und 9.

Im Median und Mittel zeigte sich eine geringe Tendenz für erhöhte IL-5-Spotzahlen. Dabei reagierten die einzelnen Patienten erneut heterogen mit einer Reduktion der Spotzahlen bei Patient 2 und 5 und einer Erhöhung bei Patient 6, 7 und 9. Für IL-17a war im Median und Mittel eine deutliche, aber ebenfalls nicht signifikante, Erniedrigung der posttherapeutischen Spotzahlen erkennbar. Diese fand sich auch bei Patient 5, 6, 7 und 9 wieder. Die höchsten Spotzahlen wurden für IFN $\gamma$ , gefolgt von IL-5 und IL-17a, gemessen.

▪ **Desmoglein3**



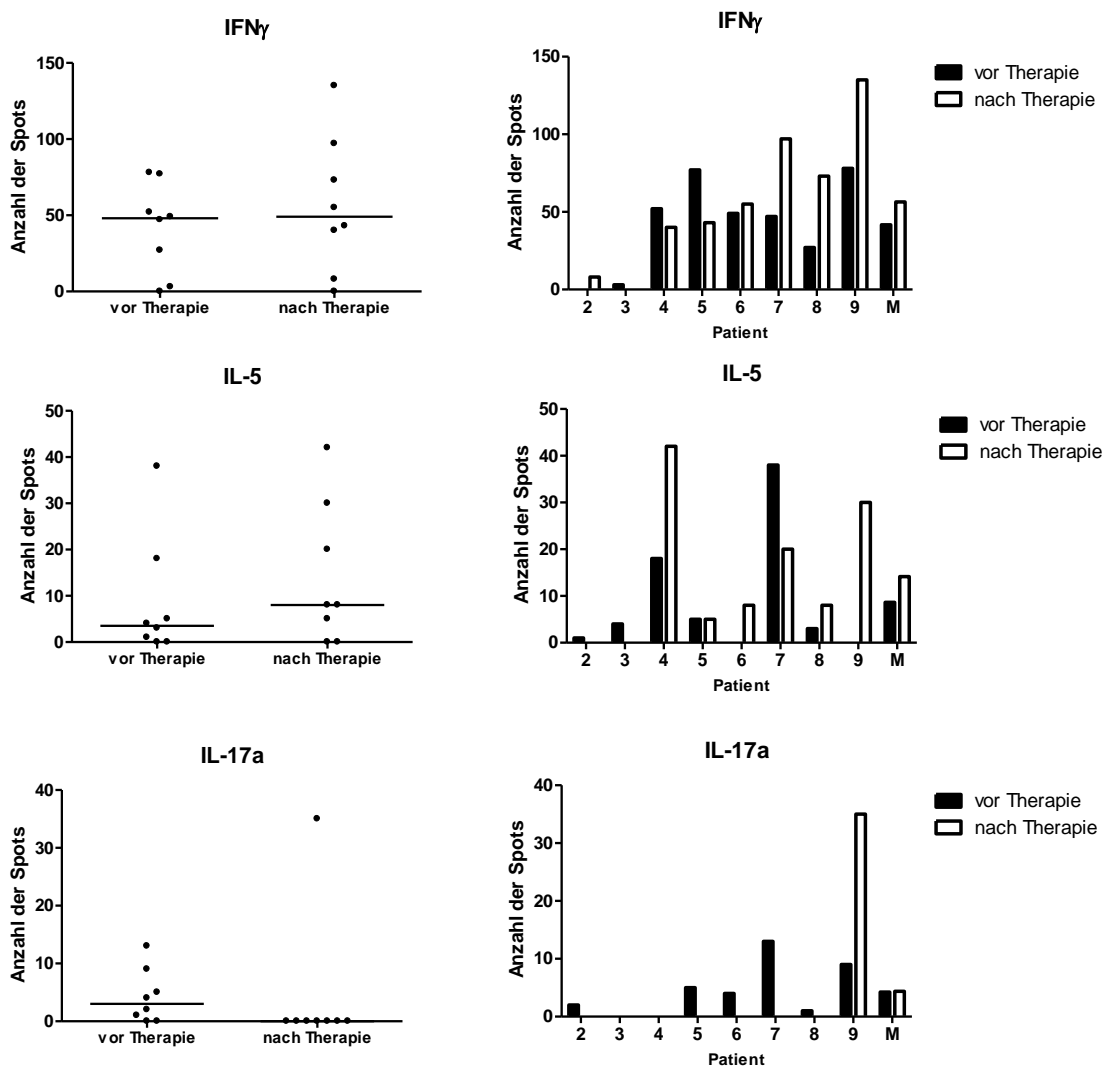
**Abbildung 4.37** Anzahl der IFN $\gamma$ -, IL-5- und IL-17a-sezernierenden T-Lymphozyten nach Stimulation mit Dsg3

$n = 8$ ; — = Median; M = Mittelwert

Während im Median nur eine minimale posttherapeutische Erhöhung der IFN $\gamma$ -Spotzahlen nach Stimulation mit Dsg3 erkennbar wurde, zeigte die Betrachtung der individuellen Patientenergebnisse ein sehr heterogenes Bild. Während für Patient 2 und 3 sowohl prä- als auch posttherapeutisch keine IFN $\gamma$ -Sekretion nachweisbar war, zeigten sich bei Patient 4 und 9 Erniedrigungen und bei Patient 5, 6, 7 und 8 Erhöhungen der Spotzahlen. Besonders auffällig war dabei Patient 8, der von prätherapeutisch null Spots mit einem posttherapeutischen Anstieg auf 133 Spots reagierte. Im Mittel erschienen die Werte demnach erhöht. Für IL-5 ließ sich im Median ein geringfügiger Anstieg der Sekretion feststellen, im Mittel erschienen die Ergebnisse allerdings erniedrigt. Die Patientenergebnisse schwankten interindividuell. Für Patient 2, 4, 6

und 8 ließ sich posttherapeutisch eine Abnahme und für die übrigen Patienten eine Zunahme verzeichnen. Für IL-17a konnten allgemein nur sehr geringe Spotzahlen ermittelt werden. Während im Median keine posttherapeutischen Veränderungen evident wurden, zeigte sich im Median eine leichte Abnahme. Diese fand sich auch bei Patient 5, 7 und 9. Zunahmen wurden für Patient 4, 6 und 8 ermittelt, während für Patient 2 und 3 keine Veränderungen nach PDT festgestellt wurden.

• **BP180-NH<sub>2</sub>**



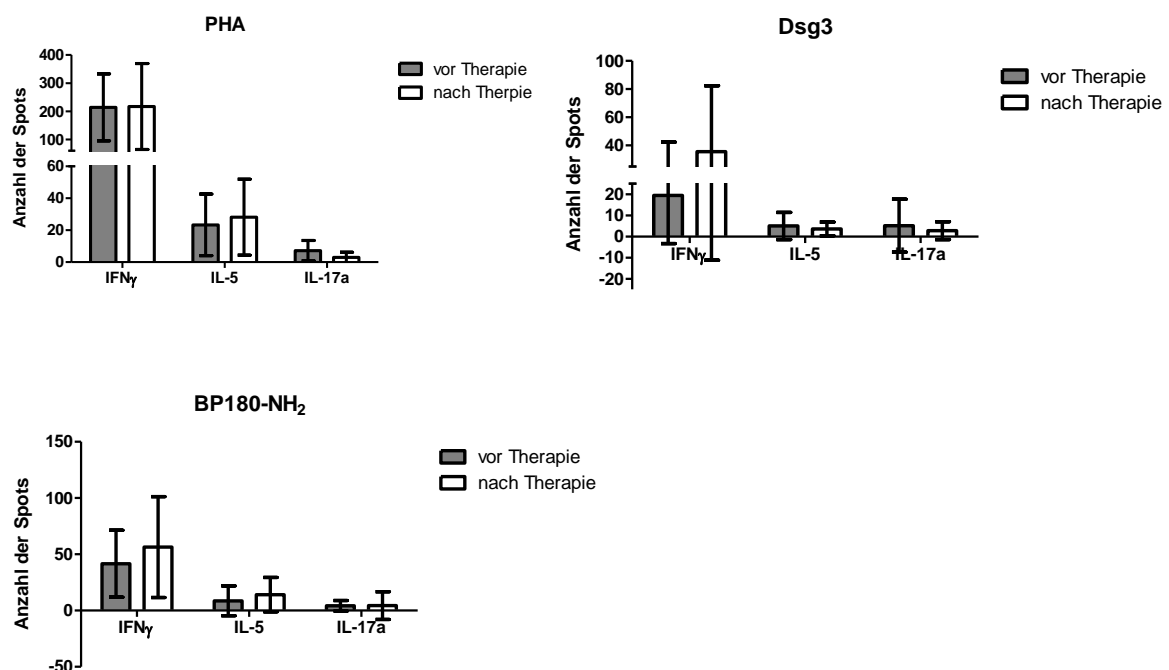
**Abbildung 4.38** Anzahl der IFN $\gamma$ -, IL-5- und IL-17a-sezernierenden T-Lymphozyten nach Stimulation mit BP180-NH<sub>2</sub>

*n* = 8; — = Median; M = Mittelwert

Für die Stimulation mit BP180-NH<sub>2</sub> ließ sich keine posttherapeutische Veränderung der IFN $\gamma$ -Sekretion im Median erkennen. Der leichte Anstieg des Mittelwertes nach PDT ergab sich aus einer erhöhten posttherapeutischen Sekretion bei Patient 2 und 6-9 und einer Abnahme

bei Patient 3-5. Im Median und Mittel fanden sich nach der Therapie leicht erhöhte IL-5 Spotzahlen. Die einzelnen Patientenergebnisse fielen jedoch sehr heterogen aus. Posttherapeutische Abnahmen waren bei Patient 2,3 und 7, Zunahmen bei Patient 4-6, 8 und 9 erkennbar. Für die Anzahl der IL-17a sezernierenden Zellen wurde posttherapeutisch eine tendenzielle Verringerung deutlich, die jedoch nicht signifikant ausfiel. Mit Ausnahme von Patient 9 fielen die posttherapeutischen Spotzahlen auf null. Patient 9 fiel durch eine Erhöhung der Spotzahlen nach PDT auf.

#### ▪ Übersicht der Ergebnisse der Enzyme-linked Immunospot Assays



**Abbildung 4.39** Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN $\gamma$ -, IL-5- und IL-17a-ELISpot-Assays

Die Übersicht der Mittelwerte ließ noch einmal Tendenzen erkennen, zeigte jedoch anhand der Standardabweichungen, dass die Werte interindividuell stark streuten.

**Tabelle 4.5**      *Ergebnisse des ELISpot-Assays: p-Werte des prä- und posttherapeutischen Vergleichs der Sekretion stimulierter T-Zellen*

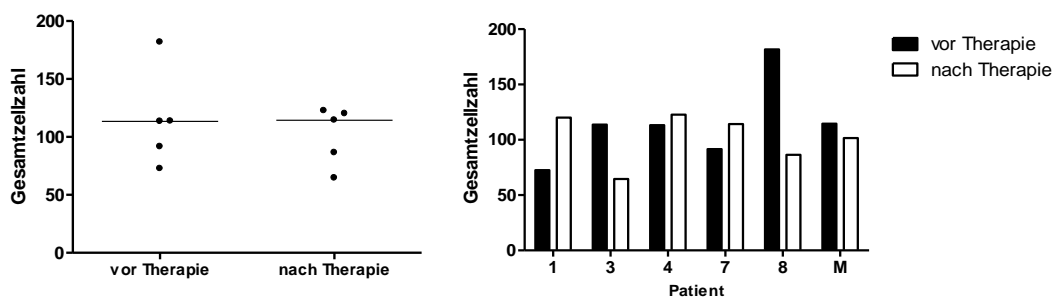
<b>ELISpot</b>	<b>vor Therapie - nach Therapie</b>
<b>PHA</b>	
IFN $\gamma$	1
IL-5	0,5725
IL-17a	0,2248
<b>Dsg3</b>	
IFN $\gamma$	0,6696
IL-5	0,9577
IL-17a	1
<b>BP180-NH2</b>	
IFN $\gamma$	0,6742
IL-5	0,3406
IL-17a	0,0562



#### 4.2.4 Immunhistopathologische Bestimmung der T-Zellsubpopulationen im läsionalen Entzündungsinfiltrat

Für die immunhistopathologische Bestimmung der verschiedenen T-Zellsubpopulationen in den läsionalen Mundschleimhautbereichen wurden die gefärbten Zellen nach einem standardisierten Verfahren ausgezählt. Daraufhin wurde das Gesamtinfiltrat der jeweiligen Färbung, die spezifisch gefärbten Zellen und ihr Anteil am Gesamtinfiltrat auf Veränderungen nach erfolgter PDT hin untersucht. Für Patient 2, 5, 6 und 9 konnte aus Ermangelung an auswertbarem Probenmaterial kein prä- und posttherapeutischer Vergleich der CD4- bzw. CD8-T-Zellpopulation vorgenommen werden.

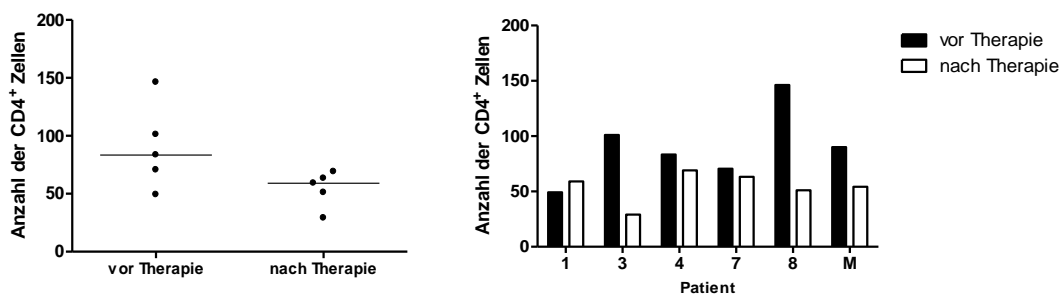
##### ■ CD4



**Abbildung 4.40** Gesamtzahl der Zellen im dermalen Entzündungsinfiltrat in der CD4-Färbung

*n = 5; — = Median; M = Mittelwert*

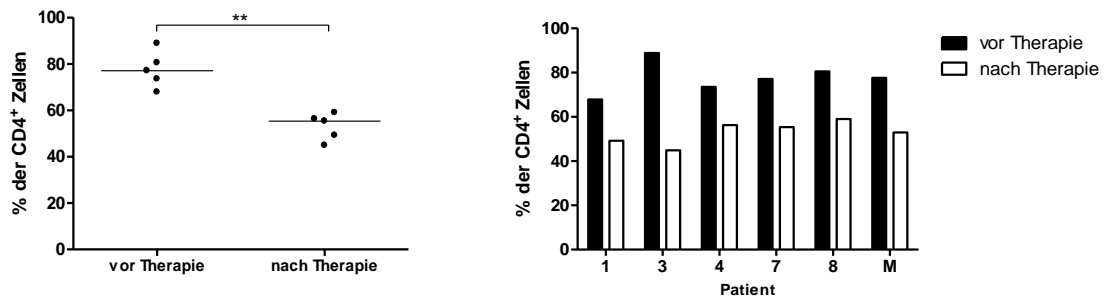
Im Median ließ sich keine Veränderung der Gesamtzellzahl nach PDT feststellen. Dennoch zeigten die einzelnen Patienten zum Teil deutliche Reaktionen. So kam es bei Patient 1, 4 und 7 zu einer Zunahme und bei Patient 3 und 8 zu einer Abnahme des Gesamtinfiltrates. Im Mittel ließ sich eine geringfügige Tendenz zur posttherapeutischen Abnahme der Werte erkennen.



**Abbildung 4.41** Anzahl der CD4<sup>+</sup> Zellen im dermalen Entzündungsinfiltrat

*n = 5; — = Median; M = Mittelwert*

In der Betrachtung der posttherapeutischen Veränderungen der absoluten Zellzahlen fiel auf, dass die Zahl der CD4<sup>+</sup>-Zellen nach erfolgter PDT im Median, Mittel und auch bei den einzelnen Patienten abnahm. Lediglich bei Patient 1 fand sich eine geringe Erhöhung der Zahl CD4<sup>+</sup> Zellen.

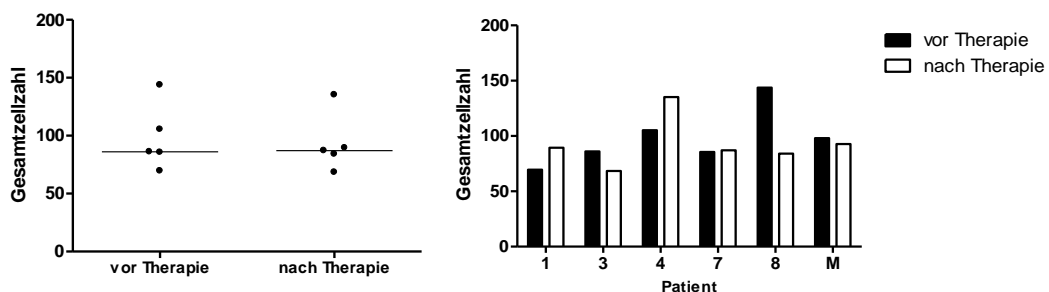


**Abbildung 4.42** prozentualer Anteil der CD4<sup>+</sup>-Zellen am Gesamtinfiltrat

*n = 5; — = Median; M = Mittelwert; \*\*  $p \leq 0,01$*

Die posttherapeutische Reduktion der CD4<sup>+</sup> Zellen wurde in der Analyse ihres Anteils am Gesamtinfiltrat noch deutlicher. Hier zeigte sich eine signifikante Abnahme des prozentualen Anteils der CD4<sup>+</sup> Zellen ( $p = 0,0079$ ). Diese Verminderung fand sich bei allen Patienten wieder.

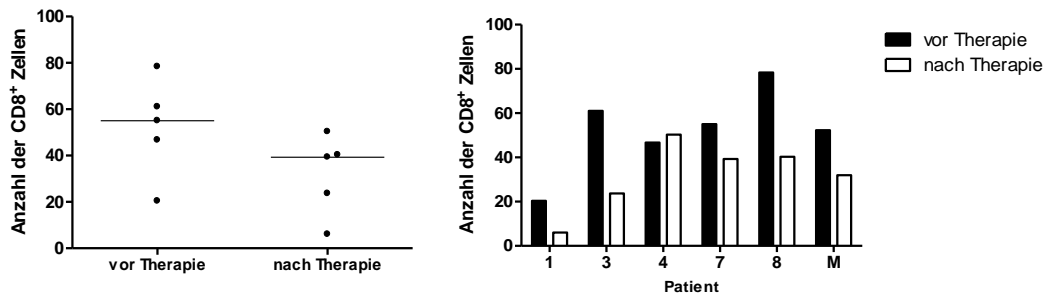
#### ▪ CD8



**Abbildung 4.43** Gesamtzahl der Zellen im dermalen Entzündungsinfiltrat in der CD8-Färbung

*n = 5; — = Median; M = Mittelwert*

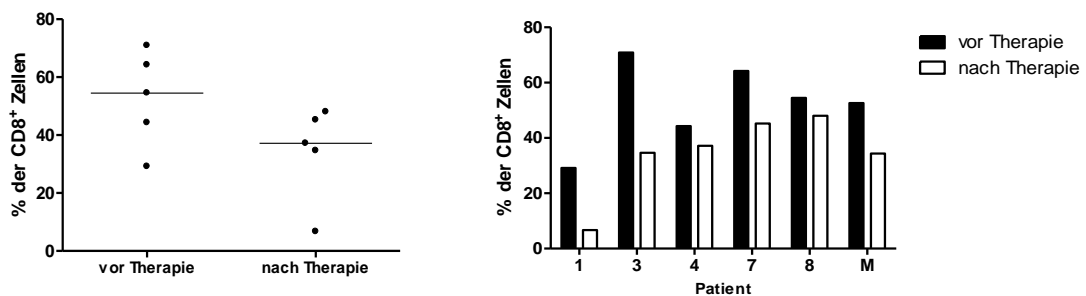
Auch in der CD8-Färbung wurde die Gesamtzahl der infiltrierenden Zellen bestimmt. Die individuellen posttherapeutischen Zu- und Abnahmen korrelieren in ihren Tendenzen mit den individuellen Patientenergebnissen der CD4-Färbung, auch wenn in dieser Schnittebene bzw. Färbung allgemein geringere absolute Zellzahlen detektiert wurden. Im Median und Mittel konnte auch hier keine signifikante Veränderung der Gesamtzellzahl nach PDT festgestellt werden.



**Abbildung 4.44** Anzahl der CD8<sup>+</sup>-Zellen im dermalen Entzündungsinfiltrat

*n = 5; — = Median; M = Mittelwert*

Posttherapeutisch zeigte sich in der Betrachtung der Anzahl der CD8<sup>+</sup> Zellen eine, wenn auch nicht signifikante, Verminderung der CD8<sup>+</sup> Zellen im subepidermalen Entzündungsinfiltrat. Abweichend von dieser Tendenz, die sich sowohl im Median als auch im Mittel widerspiegelte, war lediglich Patient 4, der mit einer geringfügigen Erhöhung der Werte von den weiteren individuellen Patientenergebnissen abwich.

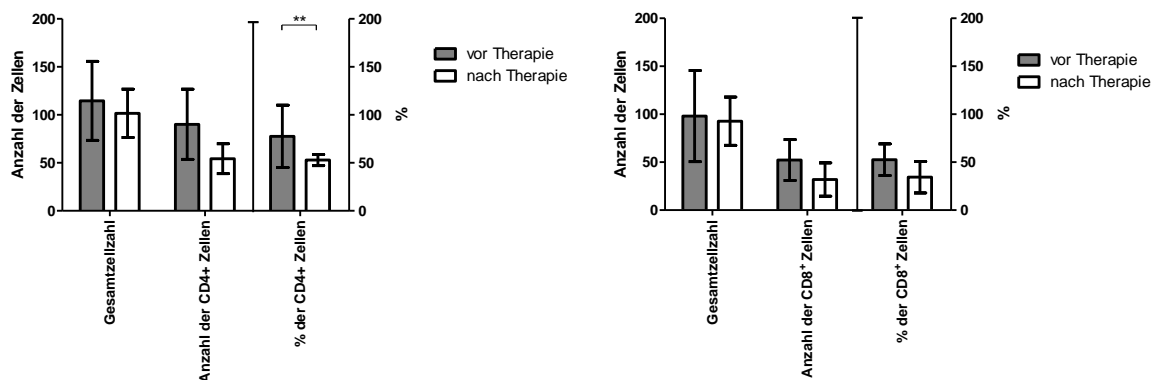


**Abbildung 4.45** prozentualer Anteil der CD8<sup>+</sup>-Zellen am Gesamtinfiltrat

*n = 5; — = Median; M = Mittelwert*

Auch für den Anteil der CD8<sup>+</sup> Zellen am Gesamtinfiltrat ließ sich eine deutliche, wenn auch nicht signifikante, Reduktion nach erfolgter PDT erkennen. Diese wurde im Median, Mittelwert und individuell bei allen Patienten evident.

▪ Übersicht der Ergebnisse in der immunhistologischen Untersuchung der T-Zellsubpopulationen im Entzündungsinfiltrat



**Abbildung 4.46** Mittelwerte und Standardabweichungen der immunhistologischen Analyse der T-Zellsubpopulationen

\*\*  $p \leq 0,01$

Im direkten Vergleich der mittleren Ergebnisse der immunhistologischen Analyse wurden nochmal die geringen Veränderungen des Gesamtinfiltrats und die Reduktion der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen nach Therapie deutlich. Dabei sanken die absoluten Zellzahlen und Anteile am Gesamtinfiltrat der verschiedenen T-Zellsubtypen jeweils um einen ähnlichen prozentualen Anteil, wobei nur bei den CD4<sup>+</sup> Zellen eine signifikante Veränderung erkennbar war. Gleichzeitig ließ sich hier erkennen, dass der Anteil der CD4<sup>+</sup> Zellen den der CD8<sup>+</sup> insgesamt überwog.

**Tabelle 4.6** *p*-Werte des prä- und posttherapeutischen Vergleichs der T-Zellsubpopulationen im dermalen Entzündungsinfiltrat

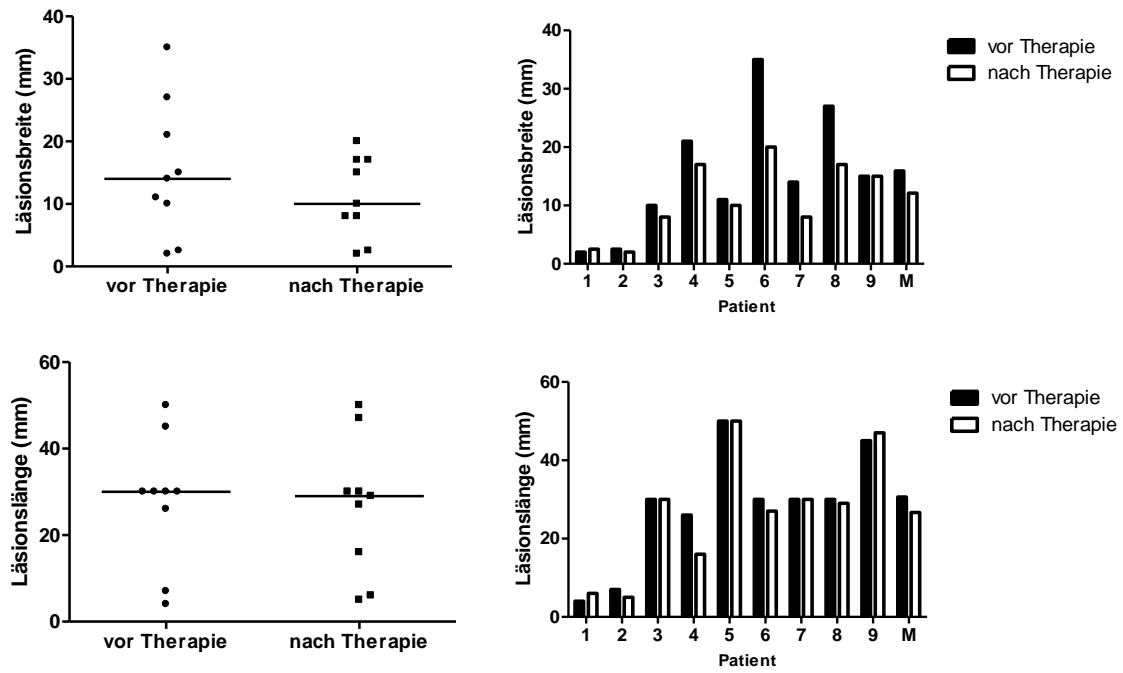
\*\*  $p \leq 0,01$

Immunhistologie	vor Therapie - nach Therapie
<b>CD4-Färbung</b>	
Gesamtzellzahl	1
Anzahl der CD4 <sup>+</sup> -Zellen	0,0952
% der CD4 <sup>+</sup> -Zellen am Gesamtinfiltrat	0,0079**
<b>CD8-Färbung</b>	
Gesamtzellzahl	0,8413
Anzahl der CD8 <sup>+</sup> -Zellen	0,1508
% der CD8 <sup>+</sup> -Zellen am Gesamtinfiltrat	0,2222

#### 4.2.5 Klinische Ergebnisse

Die Bewertung der klinischen Veränderungen nach PDT erfolgte durch die Abteilung für Parodontologie der Philipps-Universität Marburg. Die klinischen Ergebnisse sollen an dieser Stelle zusammenfassend dargestellt werden um eine Korrelation zwischen klinischen und laboranalytischen Ergebnissen zu überprüfen. Die wichtigsten Ergebnisse sind in Abbildung 4.47 grafisch dargestellt.

Die PDT wurde von allen Patienten als angenehm empfunden und lediglich bei einer Patientin konnten Irritationen im Zusammenhang mit der Therapie festgestellt werden. Die Befragung zur Lebensqualität der Patienten ergab im Mittel Verbesserungen im Bereich Schmerzen, Brennen, Mundhygiene und Nahrungsaufnahme. Zwei, vier und sechs Wochen nach der letzten PDT-Anwendung (Tag 28, 42 und 56) wurden die Läsionen in Breite und Länge vermessen und mit den Ausgangswerten vor PDT verglichen. Im Mittel zeigte sich eine Reduktion der Läsionsgröße zu allen drei Zeitpunkten, wobei die Läsionsgröße im Laufe der Zeit stetig abnahm. An Tag 56 konnte im Vergleich zum Ausgangswert bei allen Patienten eine tendenzielle Reduktion der Läsionsbreite festgestellt werden. Sie sank im Mittel von  $15,91 \pm 13,15$  mm auf  $7,22 \pm 4,57$  mm ( $p = 0,0631$ ). Auch bezüglich der Läsionslänge war im Mittel an Tag 56 eine, wenn auch nicht signifikante, Reduktion von ursprünglich  $30,63 \pm 13,7$  mm auf  $20,66 \pm 13,52$  mm erkennbar. Die Länge stagnierte lediglich bei Patient 3, während bei allen anderen Patienten eine Abnahme gemessen wurde ( $p = 0,2461$ ). Es ist zu beachten, dass zum Zeitpunkt der Entnahme posttherapeutischer Proben (Tag 28), mit deren Analyse sich die vorliegende Arbeit befasst, zum Teil eine Vergrößerung der Läsionen und nur geringfügige Veränderungen der Läsionslänge festgestellt werden konnte (vergleiche Abbildung 4.47). Zeitgleich wurden mittels „Auto-immune Bullous Skin Disorder Intensity Score“ (ABSIS) die Ausdehnung (ABSIS I) und die Schwere (ABSIS II) der Läsionen beurteilt (Pfütze et al. 2007; Daniel et al. 2012). Auch wenn im Mittel eine Verbesserung der Scores festgestellt werden konnte, zeigte sich hier ein heterogeneres Ergebnisbild als bei den anderen untersuchten Parametern. Es fanden sich interindividuell unterschiedliche Tendenzen mit Verbesserung, Stagnation oder auch Verschlechterung der ABSIS-Score-Werte.



**Abbildung 4.47 Ergebnisse der klinischen Vermessung der Läsionsgröße vor und zwei Wochen nach der letzten PDT-Anwendung**

Dargestellt sind die individuellen Ergebnisse der Läsionsbreite und -länge vor Therapie (Tag 1 = prätherapeutische Probenentnahme) und nach Therapie (Tag 28 = posttherapeutische Probenentnahme).  $n = 5$ ; — = Median; M = Mittelwert

## 5 DISKUSSION

Auch wenn die Ätiopathogenese des LP bisher nicht vollständig aufgeklärt werden konnte, so bildet doch eine T-Zell-medierte Autoimmunpathogenese mit einer Beteiligung antigenspezifischer und unspezifischer Mechanismen den Konsens der Forschung (Sugerman et al. 2002). Dabei konnte jedoch bisher kein LP-Autoantigen identifiziert werden. Durch den Studienteil A soll demnach über den „Nachweis antigenspezifischer (Dsg1, Dsg3, BP180) T-Zellen“ zur Identifizierung eines potentiellen Autoantigens und zu einem besseren Verständnis der Pathomechanismen im LP beigetragen werden. Im Studienteil B wurde überprüft, ob die PDT als nebenwirkungsarme Therapieoption zu einer „Reduktion der Entzündungsparameter beim OLP“ führen kann. Die gewonnenen Ergebnisse sollen im Folgenden anhand dieser Hypothesen (vergleiche auch Kapitel 2) diskutiert werden.

### 5.1 Studienteil A: Pathomechanismen des Lichen planus

Die Untersuchung der LP-Gruppe schließt einen Vergleich gesunder Kontrollen, LP-Patienten und BP-Patienten ein. Jedoch zeigte sich bei der Auswertung, dass die Ergebnisse der BP-Vergleichsgruppe zum Teil deutlich hinter den zu erwartenden Werten zurücklagen. Dies zeigte sich insbesondere in der Stimulation der PBMC mit dem Autoantigen des BP, BP180, im ELISpot-Verfahren. Hier zeigten die PBMC der BP-Patienten ein Reaktionsprofil, das noch hinter dem gesunder Kontrollen zurücklag, wobei eine deutlich stärkere Immunreaktion mit einer TH2-Dominanz zu erwarten gewesen wäre. Das Risiko eines systemischen methodischen Fehlers wurde durch die parallele Durchführung der Zellkultur und des ELISpot-Assays der verschiedenen Vergleichsgruppen auf ein Minimum reduziert. Eine mögliche Erklärung für die abgeschwächte Reaktion könnten neben dem höheren Alter dieser Patienten vor allem eine medikamentöse Therapie liefern. Im Studiendesign wurden Patienten mit systemischer Steroidtherapie von Beginn an ausgeschlossen, jedoch stellte sich im Rahmen der Fehleranalyse heraus, dass viele Patienten mit topischen Steroiden der Klasse IV behandelt wurden. Bei Wirkstoffen wie Clobetasolpropionat handelt es sich dabei um die am stärksten wirksamen topischen Glukokortikoide, deren immunsuppressive und antiinflammatorische Eigenschaften womöglich auch Einfluss auf die untersuchten peripheren T-Zellen und ihre Zytokinproduktion haben. Somit können aus den gewonnenen Daten der BP-Patienten keine validen Vergleiche zu den LP-Patienten oder gesunden Kontrollen gezogen werden. Aus diesem Grund soll auf die Ergebnisse der BP-Patienten in der folgenden Diskussion nicht näher eingegangen werden. Unabhängig davon konnten anhand der Analyse gesunder Kontrollen und LP-Patienten in der

vorliegenden Arbeit neue Erkenntnisse über das spezifische Immunprofil des LP und zur Identifizierung eines potenziellen Autoantigens gewonnen werden.

### **5.1.1 Chemokin- und Zytokinlevel im Plasma des peripheren Blutes**

Unspezifische Mechanismen bzw. Mediatoren wie etwa die Chemokine und Zytokine können nicht nur Hinweise auf ein Entzündungsgeschehen, sondern auch einen Einblick in die genauen immunologischen Prozesse von Autoimmunerkrankungen liefern. Bezüglich des LP wird angenommen, dass ein Ungleichgewicht von TH1- und TH2-Zytokinen einen wichtigen Beitrag zur Krankheitsentstehung und –chronizität leistet (Sugerman et al. 2002). Dabei deuten zahlreiche Studien darauf hin, dass dem LP eine TH1-Dominanz zu Grunde liegt (Wang et al. 2015b; Lu et al. 2011). Dennoch finden sich vereinzelt auch Studien, die eine TH2-Tendenz im Serum von OLP Patienten beschreiben, was die Notwendigkeit weiterer Forschungsergebnisse bezüglich des peripheren Chemo- und Zytokinprofils des LP unterstreicht (Pekiner et al. 2012).

Das IFN $\gamma$ -induzierte TH1-Chemokin CXCL10, dem über eine Rekrutierung aktivierter T-Zellen in der Pathogenese des LP eine wichtige Rolle zukommt, konnte bereits in verschiedenen Studien verstärkt im Läsionsgewebe von LP-Patienten nachgewiesen werden (Spandau et al. 1998; Iijima et al. 2003). Domingues et al. gelang auch ein Nachweis erhöhter CXCL10-Level im Serum von LP-Patienten (Domingues et al. 2015). Für die plasmatischen CXCL10-Level ließ sich dieses Ergebnis mit dem hier durchgeführten ELISA nur bedingt bestätigen. Im Median ließen sich keine Veränderungen gegenüber den gesunden Kontrollen erkennen, nur im Mittel erschienen die Werte der LP-Patienten, aufgrund einiger individuell stark erhöhten Werte, leicht erhöht. Die Tatsache, dass viele der gewonnenen Ergebnisse unterhalb des niedrigsten Standards lagen, unterstreicht die Notwendigkeit einer sensitiveren Nachweismethode. Auf die Ergebnisse der OLP-Patientengruppe, die eine Erniedrigung der CXCL10-Level aller Patienten nach Therapie zeigten, vorausgreifend, lässt sich dennoch ein, mit der verwendeten Methode nachweisbarer, spezifischer Zusammenhang der CXCL10-Plasmakonzentration mit dem Entzündungsgeschehen im LP erkennen.

Das inflammatorische Chemokin CCL5 wirkt auf Leukozyten und Monozyten, die einen CCL5-Rezeptor exprimieren, chemotaktisch und kann so über eine Rekrutierung oder Aktivierung dieser Zellen zum Entzündungsgeschehen im LP beitragen. Neben CXCL10 bildet CCL5 eines der wichtigsten TH1 assoziierten Chemokine in der Pathogenese des LP (Iijima et al. 2003; Terlou et al. 2012; Zhao et al. 2001; Wenzel et al. 2006). Verschiedene CCL5-Rezeptoren, wie etwa CCR1, CCR3 und CCR5, aber auch erhöhte CCL5-Konzentrationen in CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnten bereits im Läsionsbereich nachgewiesen werden (Iijima et al. 2003; Nogueira et al. 2015). Erst neuere LP-Forschungen beschreiben auch Veränderungen der CCL5-Konzentration



in der Peripherie. So konnten etwa Hu et al. erhöhte CCL5-Serumlevel und eine erhöhte Anzahl CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> T-Zellen im Blut von OLP-Patienten nachweisen (Hu et al. 2013). Auch die vorliegende Analyse der CCL5-Plasmalevel konnte eine signifikant erhöhte Konzentration des Chemokins im peripheren Blut der LP-Patienten gegenüber den gesunden Kontrollen bestätigen ( $p = 0,0186$ ). Dabei waren die durchschnittlichen CCL5-Plasmalevel der LP-Patienten prozentual um 53,02 % gegenüber den gesunden Kontrollen erhöht. Dennoch bleibt zu beachten, dass die gemessenen Werte innerhalb der LP-Gruppe stärkeren interindividuellen Schwankungen unterlagen als in den Vergleichsgruppen. Ursächlich mag hier eine interindividuell unterschiedlich stark ausgeprägte Läsionsausdehnung aber auch –lokalisation sein. Dennoch verdeutlichen die Ergebnisse die TH1-Tendenz des LP und lassen vermuten, dass CCL5 eine wichtige Rolle in der Pathogenese des LP spielen könnte. Die exakte Funktion von CCL5 bleibt dabei jedoch weiterhin zu klären.

Bezüglich des Chemokins und Entzündungsfaktors IL-8, zeigt die Forschung eine Erhöhung der Plasmalevel bei OLP-Patienten gegenüber gesunden Kontrollen (Kaur und Jacobs 2015; Sun et al. 2005). Aufgrund der Tatsache, dass die gewonnenen Werte der IL-8-Plasmakonzentrationsbestimmung unterhalb des niedrigsten Standards und im Bereich weniger pg/ml lagen, ist die erkennbare signifikante Reduktion der LP-Patientengruppe gegenüber den gesunden Kontrollen kritisch zu betrachten. Die erkennbare Tendenz, die gegenläufig zu den Ergebnissen von Kaur et al. ist, sollte daher mit Hilfe eines sensitiveren Testverfahrens in weiteren Untersuchungen überprüft werden.

Gleiche Zurückhaltung gilt bei der Interpretation der gemessenen plasmatischen Zytokinkonzentrationen (IFN $\gamma$ , IL-5, IL-17a). Auch hier lagen die Werte im Bereich weniger pg/ml und zum Teil unterhalb des Standardbereichs. Trotz der erkennbaren signifikanten Unterschiede zwischen den LP-Patienten und gesunden Kontrollen, sind die gewonnenen Ergebnisse bzw. die Sensitivität des ELISAs daher nicht ausreichend, um eine verlässliche Aussage über die, dem LP zugrunde liegenden, plasmatischen Zytokinprofile in der Peripherie treffen zu können.

Auch wenn die Rolle von IFN $\gamma$  im Läsionsgewebe bereits recht gut beschrieben werden konnte, so sind die Forschungsergebnisse bezüglich der Serumkonzentrationen teilweise uneinheitlich. So konnten etwa Hu et al. erhöhte IFN $\gamma$ -Level im Serum von OLP nachweisen, während Pekiner et al. und Xie et al. keine signifikanten Unterschiede bzw. leicht erniedrigte Level bei OLP-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen feststellen konnten (Hu et al. 2013; Pekiner et al. 2012; Xie et al. 2012). Auch mittels der hier gewonnenen Daten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen LP-Patienten und gesunden Kontrollen ermittelt werden.

Auch für die IL-5-Serumkonzentration konnten Pekiner et al. keine Unterschiede zwischen OLP-Patienten und gesunden Kontrollen ermitteln. Bei den vorliegenden Ergebnissen zur IL-5-Plasmakonzentration zeichnete sich jedoch eine einheitliche Tendenz zu verminderten Werten bei der LP-Gruppe ab ( $p = 0,0301$ ). Dies könnte, in Betrachtung von IL-5 als klassisches TH2-Markerzytokin, einen Hinweis auf eine verminderte periphere TH2-Antwort liefern. Gleichzeitig kann IL-5 aber auch von anderen nicht TH2-spezifischen Zellen sezerniert werden. Dazu gehören unter anderem auch  $\gamma/\delta$  T-Zellen (Takatsu 2011). Möglicherweise besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Zahl peripherer  $\gamma/\delta$  T-Zellen und der peripheren IL-5-Level. Mittels durchflusszytometrischer Analyse, die analog zu der hier für die OLP-Patientengruppe beschriebenen (Kapitel 3.2.4) durchgeführt wurde, konnte durch das Laborteam der Klinik für Allergologie und Dermatologie der Philipps-Universität Marburg, ein verminderter Anteil an  $\gamma/\delta$  T-Zellen im peripheren Blut von LP-Patienten nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse decken sich mit denen der OLP-Patientengruppe. Sie zeigten einen signifikanten Anstieg dieser Zellen nach erfolgreicher Therapie. Eine verminderte Zahl an  $\gamma/\delta$  T-Zellen bei LP-Patienten könnte demnach eine mögliche Erklärung für die verminderten IL-5 Level bieten.

Die Forschung zu IL-17a bzw. TH17-Zellen im Zusammenhang mit dem LP steht noch am Anfang. Dennoch konnten bereits erhöhte IL-17a-Serumlevel bei Patienten mit LP detektiert werden (Xie et al. 2012; Shaker und Hassan 2012). Diese Ergebnisse ließen sich im vorliegenden Versuchsansatz nicht bestätigen. Vielmehr erschienen die Werte der LP-Gruppe gegenüber denen gesunder Kontrollen erniedrigt, wobei bei der verwendeten Methode für die meisten LP-Patienten die IL-17a Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze lag, was erneut die Verwendung eines sensitiveren Verfahrens nötig macht.

### **5.1.2 T-Zellantworten**

T-Zellen spielen in der Pathogenese des LP eine zentrale Rolle. Während autoreaktive  $CD8^+$  Tc über die Induktion der Apoptose basaler Keratinozyten zu einer Störung der dermo-epidermalen Integrität führen, bleibt die Funktion der  $CD4^+$  T-Zellen in der Pathogenese weitgehend unverstanden (Sugerman et al. 2000). Verschiedene  $CD4^+$  T-Zellsubtypen wurden bereits im Zusammenhang mit dem LP beschrieben. Dazu zählen TH1, TH2, TH17 und Treg (Xie et al. 2012; Sugerman et al. 2002; Firth et al. 2015; Shen et al. 2014). Dabei wird insbesondere den TH1, die über eine Sekretion von Zytokinen wie etwa IL-2 und IFN $\gamma$  eine weitere Aktivierung von  $CD8^+$  Tc fördern könnten, eine besondere Bedeutung zugesprochen (Sugerman et al. 2002). Dennoch bleibt das (Auto-)Antigen, welches zu einer Initiierung dieser antigenspezifischen T-Zellgesteuerten Immunantwort führen könnte, bisher unentdeckt. Die starke klinische, histologische und immunologische Ähnlichkeit des PV und BP mit dem LP, deren Autoantigene

Dsg1, Dsg3 und BP180 bereits identifiziert werden konnten, bot Anlass zur Fragestellung, ob diese Antigene auch beim LP eine Rolle spielen. Dazu wurde versucht, Dsg1-, Dsg3- bzw. BP180-spezifische T-Zellen in der Peripherie von LP-Patienten nachzuweisen.

Allgemein wurde in der vorliegenden Analyse deutlich, dass die Anzahl der sezernierenden Zellen in allen Versuchsansätzen von IFN $\gamma$  über IL-5 zu IL-17a hin abnahm. Somit scheinen unabhängig von der Stimulation IFN $\gamma$ -sezernierende Zellen die dominante Zellpopulation innerhalb der isolierten PBMC auszumachen, wobei einige Zellen auch gleichzeitig verschiedene Zytokine sezernieren können. IFN $\gamma$  gilt als Markerzytokin für eine TH1-Antwort und kann von CD4<sup>+</sup> TH, CD8<sup>+</sup> Tc aber auch von natürlichen Killerzellen oder Antigenpräsentierenden Zellen sezerniert werden (Schroder et al. 2004). Bezüglich der CD8<sup>+</sup> Tc ist jedoch davon auszugehen, dass ihr Beitrag zur IFN $\gamma$ -Sekretion in der Peripherie wahrscheinlich deutlich geringer ausfallen mag als im Läsionsgewebe. IFN $\gamma$  ist eines der, im Zusammenhang mit der Pathogenese des LP, meist beschriebenen Zytokine. In zahlreichen Studien konnten erhöhte Level dieses Entzündungs- und Immunmediators im Läsionsgewebe nachgewiesen werden, während bezüglich der Serumkonzentration bisher keine einheitlichen Aussagen vorliegen (Xie et al. 2012; Khan et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnte nach Stimulation peripherer T-Zellen mit den desmosomalen Cadherinen Dsg1 und Dsg3 im Vergleich zu gesunden Kontrollen keine signifikant erhöhte Anzahl an IFN $\gamma$ -, IL-5- und IL-17a-sezernierender Zellen festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass im LP keine Dsg1- oder Dsg3 spezifischen T Zellen vorhanden sind. Es bleibt jedoch zu beachten, dass die Ergebnisse im vorliegenden Versuch innerhalb der LP-Patientengruppe stark variierten, was ein größeres Patientenkollektiv bei diesem Versuchsansatz für eine valide Aussage unerlässlich macht.

Bei der Stimulation der PBMC mit BP180-NH<sub>2</sub> zeigte sich eine signifikante Erhöhung der IFN $\gamma$ -Spotzahlen der LP-Patienten gegenüber der Gruppe gesunder Kontrollen (LP-K p = 0,0079), während keine einheitliche Reaktion der IL-5- und IL-17a-sezernierenden Zellen festgestellt werden konnte. Die Ergebnisse unterstreichen demnach nicht nur erneut die TH1-Tendenz des LP, sondern verdeutlichen zudem ein Vorhandensein BP180-NH<sub>2</sub>-spezifischer T-Zellen beim LP. Demnach scheint BP180-NH<sub>2</sub> als potentiell Autoantigen des LP eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des LP einzunehmen. BP180-NH<sub>2</sub> beinhaltet als NH<sub>2</sub>-Terminus des BP die immundominante nicht-kollagene Domäne 16 (NC16A), die bereits im Zusammenhang mit dem LP beschrieben wurde. So konnten etwa Baldo et al. T-Zellantworten gegen NC16A bei einem LP-Patienten nachweisen (Baldo et al. 2010). Auch zirkulierende Autoantikörper gegen BP180-NH<sub>2</sub> bzw. NC16A wurden mehrfach in der Literatur beschrieben (Herrero-González et al. 2015; Buijsrogge et al. 2007; Skaria et al. 1999). Dabei könnte der Nachweis von

BP180-NH<sub>2</sub>-spezifischen T-Zellen bzw. den entsprechenden Autoantikörpern mit der Läsionslokalisation und –ausdehnung korrelieren. In Betrachtung der aktuellen Forschungsliteratur scheint der Nachweis insbesondere bei mukösen Formen des LP oder beim LPP zu gelingen. Diese Hypothese könnte mit einer größeren Patientenkohorte mit dem vorliegenden Versuchsansatz überprüft werden.

Auf Stimulation mit BP180-COOH zeigten die PBMC ein tendenziell ähnliches Reaktionsprofil wie bei der Stimulation mit BP180-NH<sub>2</sub>. Dabei waren jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den LP-Patienten und gesunden Kontrollen feststellbar. Ein potentieller autoantigener Effekt von BP180-COOH ist demnach lediglich für die IFN $\gamma$ -sezernierende Zellpopulation denkbar, und bleibt durch weitere Studien zu überprüfen.

## **5.2      Studienteil B: Photodynamische Therapie des oralen Lichen planus**

Den klinischen Ergebnissen dieser Studie zufolge kann die PDT als nichtinvasive, für den Patienten angenehme und wirkungsvolle Therapieoption beim OLP bewertet werden. Die Effektivität der Behandlung spiegelte sich klinisch in einer über den Untersuchungszeitraum stetigen Abnahme der Läsionsgröße, einer Verbesserung der Lebensqualität der Patienten und gleichzeitig minimalen Nebenwirkungen wider. Dennoch konnte keine vollständige Remission der Läsionen erreicht werden, daher ist die PDT, so wie sie in der vorliegenden Studie angewandt und untersucht wurde, zunächst als rein symptomatische, nicht jedoch als kurative Therapie, zu betrachten. Unabhängig davon kann die PDT anhand der klinischen Ergebnisse als erfolgreich bewertet und von einem Behandlungserfolg gesprochen werden. Demnach sollen in der folgenden Interpretation der laboranalytischen Versuchsergebnisse die prätherapeutischen Werte als pathologischer Ausgangszustand und die posttherapeutischen Werte als Annäherung an die physiologischen Parameter betrachtet werden.

Ein spezifischer Effekt der PDT war nicht nur klinisch nachweisbar, auch in der Analyse des peripheren Blutes und läsionaler Mundschleimhautbiopsien waren signifikante Veränderungen der untersuchten T-Zellpopulationen nach PDT erkennbar. In Korrelation mit den positiven klinischen Therapieergebnissen, scheinen diese immunologischen Veränderungen den Behandlungserfolg auf immunologischer Ebene widerzuspiegeln. Die spezifischen Veränderungen der untersuchten Parameter sind demnach mit aller Wahrscheinlichkeit als Übergang von einem „pathologischen“ zu einem „physiologischen“ Immunprofil zu interpretieren. Es bleibt jedoch zu beachten, dass der klinische Effekt der PDT sechs Wochen nach letzter PDT am deutlichsten war. Die hier untersuchten Proben wurden zwei Wochen nach der letzten PDT gewonnen und zeigen somit lediglich eine Momentaufnahme der spezifischen reaktiven immunologischen Veränderungen. Es ist wahrscheinlich, dass im Laufe der Therapie bzw. des Beobachtungszeitraums mit verschiedenen immunologischen Reaktionsprofilen zu rechnen ist. Ein weiterer Faktor, der bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen bleibt, ist die unterschiedliche Schwere der Erkrankung der einzelnen Patienten. Eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der zu messenden Immunreaktion und der Größe der behandelten Läsionsfläche, dem Läsionstyp, der Läsionslokalisation, aber auch der Erkrankungsdauer ist wahrscheinlich. So konnten etwa Sadaksharam et al. eine signifikant verringerte Wirkung der PDT bei Patienten mit langer Erkrankungsdauer feststellen (Sadaksharam et al. 2012). Desweiteren zeigten Sobaniec et. al, dass die Effektivität der PDT von der Lokalisation der Läsion beeinflusst werden kann und besonders im Bereich der mastikatorischen Mundschleimhaut beeinträchtigt ist (Sobaniec et al. 2013). Zudem soll erwähnt werden, dass natürliche Schwankungen, wie etwa zirkadiane Ver-

änderungen, der untersuchten Blutparameter, insbesondere bei längeren Beobachtungszeiträumen, bei der Ergebnisbetrachtung nicht außer Acht gelassen werden sollten. Durch PDT-Anwendungen bei einem größeren Patientenkollektiv, längere Beobachtungszeiträume und häufigere Probenentnahmen könnte die dauerhafte Effizienz noch besser beschrieben und die Effektivität der PDT beim OLP möglicherweise verbessert werden. Nach bestem Wissen wurde in der vorliegenden Arbeit der periphere immunologische Effekt der PDT beim OLP erstmals laboranalytisch untersucht und beschrieben.

### **5.2.1 Periphere T-Zellsubpopulationen**

Bezüglich der durchflusszytometrischen Analyse peripherer T-Zellsubpopulationen finden sich in der Literatur keine ausreichenden Daten, die für einen Vergleich der hier gewonnenen Ergebnisse herangezogen werden könnten.

Für den Anteil Treg ( $CD25^+CD127^{low}$ ) an den  $CD4^+$  T-Zellen des peripheren Blutes konnten keine einheitlichen Veränderungen nach PDT ermittelt werden. Während Veränderungen dieser Zellpopulation im Läsionsgewebe beim LP bereits durch verschiedene Autoren beschrieben wurden, fanden sich bisher keine Studien über periphere Treg im Zusammenhang mit dem LP. Dennoch ist ein möglicher Effekt der PDT auf die T-Zellsubpopulation auch in der Peripherie nicht völlig auszuschließen, da in dieser Studie bei einigen Patienten messbare reaktive Veränderungen festgestellt werden konnten. Vergleichende Studien mit gesunden Kontrollen könnten weitere Antworten zur Rolle peripherer Treg beim LP liefern.

Auch für die Anteile der  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen an den peripheren Lymphozyten konnten nur sehr geringere Veränderungen zum Untersuchungszeitpunkt ermittelt werden. Dennoch zeigte sich eine geringe Tendenz zur Zunahme der  $CD8^+$  Zellen nach Therapie, während der Anteil der  $CD4^+$  entsprechend im selben Maße geringfügig abnahm. Auch wenn die Ergebnisse aufgrund ihrer sehr geringen posttherapeutischen Veränderungen vorsichtig zu interpretieren sind, lässt sich dennoch eine Hypothese formulieren, die eine pathogene Verschiebung des Anteils peripherer  $CD8^+$  und  $CD4^+$  T-Lymphozyten zu Gunsten der  $CD4^+$  beim erkrankten OLP-Patienten postuliert. Beim erkrankten Patienten erscheint der periphere Anteil der  $CD8^+$  T-Lymphozyten demnach gegenüber dem gesunden erniedrigt. Eine mögliche Erklärung für diesen relativen Verlust peripherer  $CD8^+$  T-Lymphozyten bei aktivem Erkrankungsgeschehen liefert die Einwanderung dieser Zellen in das Läsionsgewebe, wo sie in vermehrter Anzahl in zahlreichen Studien nachgewiesen werden konnten (Sugerman et al. 2002). Die histologischen Untersuchungen des Entzündungsinfiltrates lieferten zum Teil Ergebnisse, die diese Hypothese unterstreichen (vergleiche Kapitel 5.2.4). Möglicherweise kommt es zu Auswanderung der  $CD8^+$  T-Lymphozyten aus dem Läsionsgebiet zurück in die Peripherie. Durch die erfolgreiche

PDT scheint sich demnach das Verhältnis von  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen wieder den physiologischen Relationen anzunähern, wobei auch hier ein Vergleich mit gesunden Kontrollen unerlässlich bleibt.

$\alpha/\beta$ -TCR<sup>+</sup>-Lymphozyten bilden den Hauptanteil der zirkulierenden T-Zellen und erlauben, meist mit Hilfe der MHC-Rezeptoren, eine Erkennung von Antigenen.  $\gamma/\delta$ -TCR<sup>+</sup> T-Zellen machen beim Gesunden jedoch mit 1-10 % nur einen kleinen Teil der zirkulierenden T-Lymphozyten aus (Attaf et al. 2015). Der Anteil und die Funktion der TCR-tragenden Lymphozyten in Peripherie und Läsion konnten für den LP noch nicht eindeutig beschrieben werden. Während für den Anteil  $\alpha/\beta$ -TCR<sup>+</sup> T-Zellen an der Lymphozytenpopulation nach PDT nur eine geringfügige Zunahme festgestellt werden konnte, zeigte sich der Anteil der  $\gamma/\delta$ -TCR<sup>+</sup> T-Zellen posttherapeutisch signifikant erhöht ( $p = 0,04$ ). Dies deutet auf einen spezifischen Effekt der PDT auf diese T-Zellsubpopulation hin und lässt einen direkten Zusammenhang zwischen der Zahl der  $\gamma/\delta$ -TCR<sup>+</sup> T-Zellen und dem Erkrankungszustand vermuten. Da die PDT als erfolgreich bewertet wurde, ist demnach davon auszugehen, dass die Zahl der  $\gamma/\delta$ -TCR<sup>+</sup> T-Zellen bei erkrankten OLP-Patienten niedriger ist als bei gesunden Probanden. Die peripheren  $\gamma/\delta$ -TCR<sup>+</sup> T-Zellen könnten somit eine bisher kaum beschriebene Rolle in der Pathogenese des LP spielen. Gadenne et al. gelang der Nachweis einer erhöhten Zahl  $\gamma/\delta$ -TCR<sup>+</sup> T-Zellen im Läsionsgewebe von LP-Patienten (Gadenne et al. 1994). Somit könnte vermutet werden, dass es beim aktiven LP zu einer Einwanderung dieser Zellen aus der Peripherie in das Läsionsgewebe kommt. Diese Wanderung scheint dabei reversibel zu sein, sodass eine Rückwanderung der Zellen in die Peripherie die scheinbar erhöhten Werte nach der erfolgreichen Therapie erklären könnte. Die bisher immer noch nicht eindeutig geklärte Funktion der TCR  $\gamma/\delta$  und die Ursachen des Zusammenhangs der Zahl der  $\gamma/\delta$ -TCR<sup>+</sup> T-Zellen mit der OLP-Erkrankung bieten Anlass für vertiefende Untersuchungen.

Der prozentuale Anteil der CCR4<sup>+</sup> Zellen an den  $CD3^+CD8^+$  T-Zellen des peripheren Blutes nahm nach erfolgter PDT im Mittel ab. Die Patienten 1-3 bildeten eine Ausnahme von diesem Trend. Dieses Ergebnis mag, in Korrelation zu der allgemeinen Zunahme  $CD3^+CD8^+$  T-Zellen nach PDT, zunächst konträr erscheinen. Dennoch scheint auch dieses Ergebnis den Therapieerfolg zu verdeutlichen. Durch eine verminderte Expression des skin-homing-factors CCR4 auf peripheren  $CD8^+$  T-Zellen würde die, etwa durch die Chemokine CCL17 und CCL22 induzierte, Einwanderung der  $CD8^+$  Zellen in das Läsionsgewebe reduziert und der Anteil der  $CD8^+$  T-Zellen in der Peripherie nähme zu. Daraus leitet sich die Hypothese ab, dass der CCR4 der  $CD3^+CD8^+$  T-Zellen einen wichtigen Faktor bei der Migration der Tc von der Peripherie in das läSIONALE Gewebe darstellt. Die individuellen Patientenergebnisse der Analyse des Anteils der CCR4<sup>+</sup> Zellen an den  $CD3^+CD8^+$  T-Zellen korrelieren mit denen der  $CD3^+CD8^+$  T-Zellen. Im Median zeigt

te sich jedoch keine Veränderung, sodass nur von einer leichten Abnahme der Werte gesprochen werden kann. CCR4 wird als klassischer Typ2-Zytokinrezeptor beschrieben und konnte bereits durch Iijima et. al im läsionalen Entzündungsinfiltrat von OLP-Patienten nachgewiesen werden. Dieser postulierte zudem, dass einige der infiltrierenden mononuklearen Zellen sowohl CCR4 als auch die typischen Typ1-Zytokinrezeptoren CCR5 und CXCR3 exprimieren (Iijima et al. 2003). Die Literatur lässt jedoch bisher umfangreiche Analysen dieses, scheinbar für die Pathogenese des LP wichtigen, Rezeptortyps vermissen. Der prozentuale Anteil der CD27<sup>+</sup> Zellen an den CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen des peripheren Blutes weist eine leichte Tendenz Richtung Erhöhung der Werte nach erfolgter Therapie auf. Mattila et. al konnten bereits eine vermehrte Anzahl an CD27<sup>+</sup> B- und T-Lymphozyten im Läsionsgewebe von OLP-Patienten nachweisen (Mattila et al. 2011). Ein Zusammenhang zwischen der nach PDT generell erhöhten Anzahl der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten und dem leichten Anstieg der CD27<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist wahrscheinlich. Ob diese möglicherweise aus dem ehemaligen Läsionsgewebe stammen könnten, müsste durch weitere histologische Untersuchungen des Läsionsgewebes überprüft werden.

Die Analyse der „aktivierten“ CD137<sup>+</sup> T-Zellen zeigte nach erfolgter PDT eine deutlich erkennbare Reduktion sowohl des Anteils der CD137<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen als auch der CD137<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Auch wenn die Literatur bisher keine Untersuchungen des CD137-Oberflächenantigens im Zusammenhang mit dem LP liefert, unterstreichen die hier gewonnenen Ergebnisse deutlich die Beteiligung aktivierter CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Pathogenese des (O)LP. Dabei scheint das CD137-Oberflächenantigen, welches als costimulatorisches Signal der Aktivierung von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen wirkt, ein wichtiges, bisher wenig beachtetes, Element in der Kette der pathogenen Prozesse des LP darzustellen. Da die Tendenz zur Reduktion des Anteils CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen an den CD137<sup>+</sup> T-Zellen bereits in der Peripherie nachweisbar war, ist davon auszugehen, dass dieser Effekt im Läsionsgewebe noch deutlicher zu beobachten ist. Würden die hier beschriebenen Beobachtungen durch weitere Studien bestätigt, so könnte die Analyse der peripheren CD137<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen möglicherweise zukünftig auch als leicht bestimmbarer Marker für den Erfolg verschiedener Therapien beim LP herangezogen werden.



### 5.2.2 Chemokin- und Zytokinlevel im Plasma und Speichel

Bei der Bewertung der Chemokin- und Zytokinlevel in Plasma und Speichel ist, ebenso wie bei der LP-Patientengruppe, zu beachten, dass der Aussagewert der Ergebnisse durch sensitivere Nachweisverfahren deutlich verbessert werden könnte.

Die in Abschnitt 5.1.1 bereits innerhalb der LP-Gruppe erkennbare Tendenz zu einer pathologischen Erhöhung der plasmatischen CXCL10-Level konnten bei der OLP-Patientengruppe signifikant verdeutlicht werden. Hier konnte nach erfolgter PDT eine signifikante Reduktion der CXCL10-Level ( $p = 0,0056$ ) beobachtet werden. Die Abnahme dieses, auf aktivierte T-Zellen chemotaktisch wirkenden, Chemokins deckt sich auch mit anderen hier erhaltenen Ergebnissen. So ist ein direkter Zusammenhang zwischen der Abnahme der CXCL10-Level und der Abnahme der CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten im läsionalen Entzündungsinfiltrat, sehr wahrscheinlich. Die hier gewonnenen Ergebnisse bestätigen damit die von Domingues et. al postulierte erhöhte CXCL10-Serumkonzentration bei LP-Patienten und hebt CXCL10 als bedeutenden Co-Faktor der Pathogenese des (O)LP hervor (Domingues et al. 2015). Auch die CXCL10-Konzentrationen im Speichel nahmen nach erfolgter PDT im Mittel ab und bestätigten damit die Ergebnisse. CXCL10 in Blut oder Speichel könnte demnach einen leicht zugänglichen Biomarker für den Erfolg einer Therapie bieten. Dennoch ist zu beachten, dass erhöhte CXCL10-Level als nicht spezifisch für eine LP-Erkrankung bewertet werden können, da diese auch bei anderen Autoimmunerkrankungen wie etwa dem Sjögren-Syndrom nachgewiesen werden konnten (Hernández-Molina et al. 2011).

Für die plasmatischen CCL5-Level konnten im Mittel keine Veränderungen nach PDT beobachtet werden. Die Patienten zeigten an dieser Stelle ein sehr heterogenes Profil. Ein spezifischer Effekt der PDT auf die CCL5-Plasmakonzentration konnte somit nicht nachgewiesen werden. Im Speichel erschienen die CCL5-Level nach Therapie sogar erhöht. Vergleichbare Studien, die zu einer Erklärung dieses Effekts beitragen könnten, sind bisher nicht verfügbar. Es ist nicht auszuschließen, dass sich die nach erfolgreicher Therapie zu erwartende Reduktion der CCL5-Level sowohl im Plasma und Speichel erst zu einem späteren Zeitpunkt der Behandlung bzw. Untersuchung einstellt, sodass weitere Probenentnahmen zu anderen Zeitpunkten ebenfalls sinnvoll erscheinen.

Für die Veränderungen der plasmatischen IL-8-Level nach PDT kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse keine wissenschaftlich fundierte Aussage getroffen werden. Bezüglich der IL-8-Konzentrationen im Speichel konnten zwar valide Konzentrationswerte bestimmt werden, jedoch zeigten die Patienten ein sehr heterogenes Reaktionsprofil, sodass im Mittel keine signifikanten Veränderungen der Konzentration nach PDT ermittelt werden konnten. Kaur et. al

gelang es, erhöhte IL-8-Level im Speichel von OLP-Patienten nachzuweisen, sodass eine Reduktion der IL-8-Level im Speichel nach erfolgreicher Therapie zu erwarten gewesen wäre (Kaur und Jacobs 2015). Ein spezifischer Effekt der PDT ließ sich mit dem vorliegenden Versuchsansatz für IL-8 demnach nicht bestätigen.

Ebenso wie bei der LP-Patientengruppe sind die Ergebnisse der Zytokinlevel in Plasma und Speichel aufgrund der zu geringen Sensitivität der ELISAs zurückhaltend zu betrachten. Für die Ergebnisse der IFN $\gamma$ - und IL-5-Analyse kann demnach keine valide Aussage getroffen werden. Lediglich bezüglich IL-17a wurde eine gewisse Tendenz zur Erhöhung der plasmatischen IL-17a-Level nach PDT festgestellt. Mit aller gebotenen Vorsicht lässt sich hier dennoch ein Zusammenhang zu den Ergebnissen der LP-Gruppe stellen. Denn auch da zeigte sich, dass beim aktiven LP gegenüber gesunden Kontrollen mit verminderten plasmatischen IL-17a-Leveln zu rechnen ist. Diese Ergebnisse decken sich nicht mit den von Xie und Shaker beschriebenen erhöhten plasmatischen IL-17a-Leveln bei LP-Patienten (Xie et al. 2012; Shaker und Hassan 2012). Die von Wang et al. beschriebene, mit der Schwere der Läsion korrelierende, erhöhte IL-17a-Konzentration im Speichel von OLP-Patienten konnte jedoch durch die vorliegende Analyse bestätigt werden (Wang et al. 2015a). Posttherapeutisch zeigte sich im Mittel und Median eine tendenzielle Reduktion der IL-17a-Level. Eine Abnahme dieses proinflammatorischen Zytokins im Speichel und damit in unmittelbarer Umgebung der Läsion, deutet demnach nicht nur auf einen Entzündungsrückgang sondern auch auf eine direkte Beteiligung in der Pathogenese des LP hin.

### **5.2.3 T-Zellantworten**

Bei der Untersuchung der prä- und posttherapeutischen peripheren T-Zellantworten wurde zunächst mittels PHA-Stimulation überprüft, ob es, unabhängig von einem spezifischen potentiell antigenen Stimulus, durch die PDT zu einem Rückgang der IFN $\gamma$ -, IL-5- oder IL-17a-medierten Immunantworten kommen kann. Dabei ließ sich für IFN $\gamma$  im Median eine leichte, nicht signifikante, posttherapeutische Abnahme der Spotzahlen erkennen. Durch die recht heterogenen Reaktionen der einzelnen Patienten lässt sich somit der zunächst vermutete Rückgang einer IFN $\gamma$ -medierten Immunantwort zum Untersuchungszeitpunkt nicht sicher bestätigen. Aufgrund der Annahme, dass den IFN $\gamma$ -sezernierenden TH1-Zellen in der Pathogenese des LP jedoch eine zentrale Rolle zuzukommen scheint, bleibt eine Abnahme der Spotzahlen zu einem späteren Untersuchungszeitpunkt weiterhin wahrscheinlich. Auch die Anzahl der IL-5 sezernierenden Zellen ließ keine einheitliche Tendenz zur Zu- oder Abnahme nach der PDT erkennen, sodass auch hier weitere Probenentnahmen zu einem späteren Zeitpunkt zu empfehlen sind. Für IL-17a dagegen zeigte sich zum Untersuchungszeitpunkt eine deutliche Ten-

denz zur Abnahme der IL-17a-Sekretion bzw. der IL-17a sezernierenden Zellen nach erfolgter PDT. Dies bestätigt die Annahmen, dass auch die peripheren IL-17a sezernierenden Th17-Zellen aktiv zur Pathogenese des (O)LP beitragen und spiegelt die Resultate der ELISpot-Versuche der LP-Gruppe wider. Diese These wird weiterhin durch den Nachweis einer erhöhten Zahl von Th17-Zellen durch Xie et. al im peripheren Blut unterstützt (Xie et al. 2012). Die hier gewonnenen Ergebnisse geben jedoch auch Anlass, die Versuchsergebnisse der IL-17a-Konzentration im Plasma weiter als kritisch zu betrachten (vergleiche 5.1.1 und 5.2.2). Für die Stimulation der PBMC mit Dsg3 und BP180-NH<sub>2</sub> ließ sich innerhalb der Patientengruppe keine einheitliche Reaktionstendenz nach der PDT feststellen. Die individuellen Patientenreaktionen zeigten dieselben Tendenzen wie in der unspezifischen Stimulation mit PHA. Ein spezifischer Effekt der PDT ist demnach für die IFN $\gamma$  und IL-5 sezernierenden PBMC zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht nachweisbar. Die Ergebnisse für IL-17a nach BP180-NH<sub>2</sub>-Stimulation spiegelten jedoch auch hier eine Tendenz zu einer posttherapeutischen Abnahme der Spotzahlen wider. Auch wenn Unterschiede in der Zahl der eingesetzten Zellen keinen direkten Vergleich der ELISpot-Ergebnisse der LP- und OLP-Gruppe erlauben, so scheinen sich die IFN $\gamma$ -Spotzahlen nach BP180-NH<sub>2</sub>-Stimulation doch insoweit zu ähneln, dass eine potentiell antigene Wirkung dieses Basalmembranbestandteils auch beim OLP angenommen werden kann.

#### **5.2.4 T-Zellsubpopulationen läsionaler Mundschleimhautbiopsien**

In der Betrachtung der Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung läsionaler Mundschleimhautbiopsien bleibt zu beachten, dass mit keiner klinischen Methode eine Gewinnung exakt identischer prä- und posttherapeutischer Proben erlangt werden kann. Durch unterschiedliche Lokalisationen der Entnahmestellen bzw. durch die Gewebsreaktion nach der Probenentnahme kann die Zellzahl oder die Zusammensetzung des Entzündungsinfiltrats in den untersuchten Mundschleimhautproben unabhängig von der erfolgten Therapie prä- und posttherapeutisch variieren. Zudem ist auch bei der verwendeten Auszählmethodik ein subjektiver Faktor nicht auszuschließen. Die vorliegende Analyse lieferte jedoch trotz dieser methodischen Ungenauigkeiten, profunde Ergebnisse, die als spezifische Reaktionen des Gewebes auf die PDT gewertet werden können. Durch ein größeres Patientenkollektiv könnte die Aussagekraft dieser ersten vielversprechenden Ergebnisse weiter verbessert werden.

Bezüglich der CD4-Färbung zeigte sich eine posttherapeutische Reduktion der Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Entzündungsinfiltrat. Neben dieser Reduktion der absoluten Zellzahlen zeigte sich der Effekt in der signifikanten Abnahme des Anteils der CD4<sup>+</sup> T-Zellen am Gesamtinfiltrat noch deutlicher ( $p = 0,0079$ ). Diese Ergebnisse bestätigen den Stand der aktuellen Forschung, der erhöhte Zahlen an CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Läsionsgewebe beschreibt und ihnen wichtige Rolle in

der Pathogenese des LP beimit (Sugerman et al. 2002; Khan et al. 2003). Zudem unterstreichen sie die immunmodulatorische Wirksamkeit der PDT. Für genauere Aussagen über die Rolle der läsionalen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten ist jedoch eine weitere Differenzierung dieser vielfältigen T-Zellpopulation nötig.

Ein ähnlicher posttherapeutischer Rückgang konnte auch bei der läsionalen CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation beobachtet werden, auch wenn dieser nicht signifikant ausfiel. Das vermehrte Vorkommen der CD8<sup>+</sup> Tc im Läsionsgewebe und ihre Rolle in der Pathogenese des LP mit der apoptoseinduzierenden Wirkung auf die basalen Keratinozyten wurde in der Literatur vielfach beschrieben (Sugerman et al. 2000). Anhand der vorliegenden Analyse lässt sich ein vermehrtes Vorkommen dieser T-Zellsubpopulation im aktiven Läsionsgewebe bestätigen, was eine direkte Beteiligung am Pathomechanismus des LP impliziert. Die in Kapitel 5.2.1 beschriebene leichte posttherapeutische Zunahme der peripheren CD8<sup>+</sup> T-Zellen könnte ein Indiz für eine Auswanderung der läsionalen CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten zurück in die Peripherie bilden. Wobei bei dieser Hypothese das auf den ersten Blick widersprüchliche Phänomen einer gleichzeitigen posttherapeutischen peripheren und läsionalen Abnahme der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten zu untersuchen bleibt.

Sowohl in der CD4- als auch in der CD8-Färbung fiel auf, dass die Gesamtzahl der infiltrierenden Zellen posttherapeutisch nur geringfügig abnahm. Aufgrund des klinischen Rückgangs der Läsionen wäre hier eine deutlichere Abnahme des Entzündungsinfiltrates zu erwarten gewesen. Es ist nicht auszuschließen, dass dieser Effekt zu einem späteren Zeitpunkt deutlicher nachzuweisen gewesen wäre. In Korrelation mit den oben genannten Ergebnissen der immunhistologischen Untersuchung des Läsionsgewebes stellt sich die Frage nach der konkreten Zusammensetzung des Entzündungsinfiltrats insbesondere nach Therapie. Bei einer etwa konstanten Gesamtzellzahl und posttherapeutisch abnehmenden Anteilen der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist anzunehmen, dass andere Zellpopulationen posttherapeutisch vermehrt auftreten. Eine Identifizierung müsste in nachfolgenden Studien erfolgen.

## 6 LITERATUR

- Amber KT, Staropoli P, Shiman MI, Elgart GW, Hertl M (2013) *Autoreactive T cells in the immune pathogenesis of pemphigus vulgaris*. *Exp Dermatol* 22, S. 699–704. doi:10.1111/exd.12229.
- Andreasen JO (1968) *Oral lichen planus. 1. A clinical evaluation of 115 cases*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 25, S. 31–42.
- Assouly P, Reygagne P (2009) *Lichen planopilaris: update on diagnosis and treatment*. *Semin Cutan Med Surg* 28, S. 3–10. doi:10.1016/j.sder.2008.12.006.
- Attaf M, Legut M, Cole DK, Sewell AK (2015) *The T cell antigen receptor: the Swiss army knife of the immune system*. *Clin Exp Immunol* 181, S. 1–18. doi:10.1111/cei.12622.
- Axéll T, Rundquist L (1987) *Oral lichen planus--a demographic study*. *Community Dent Oral Epidemiol* 15, S. 52–56.
- Baggiolini M, Clark-Lewis I (1992) *Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine*. *FEBS Lett* 307, S. 97–101.
- Baldo M, Bailey A, Bhogal B, Groves RW, Ogg G, Wojnarowska F (2010) *T cells reactive with the NC16A domain of BP180 are present in vulval lichen sclerosus and lichen planus*. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 24, S. 186–190. doi:10.1111/j.1468-3083.2009.03375.x.
- Boyd AS, Neldner KH (1991) *Lichen planus*. *J Am Acad Dermatol*, S. 593–619.
- Buijsrogge JJA, Hagel C, Duske U, Kromminga A, Vissink A, Kloosterhuis AJ, van der Wal, J E, Jonkman MF, Pas HH (2007) *IgG antibodies to BP180 in a subset of oral lichen planus patients*. *J Dermatol Sci* 47, S. 256–258. doi:10.1016/j.jdermsci.2007.05.011.
- Chieriegato C, Zini A, Barba A, Magnanini M, Rosina P (2003) *Lichen planopilaris: report of 30 cases and review of the literature*. *Int J Dermatol* 42, S. 342–345.
- Cooper SM, Dean D, Allen J, Kirtschig G, Wojnarowska F (2005) *Erosive lichen planus of the vulva: weak circulating basement membrane zone antibodies are present*. *Clin Exp Dermatol* 30, S. 551–556. doi:10.1111/j.1365-2230.2005.01866.x.
- Daniel BS, Hertl M, Werth VP, Eming R, Murrell DF (2012) *Severity score indexes for blistering diseases*. *Clin Dermatol* 30, S. 108–113. doi:10.1016/j.clindermatol.2011.03.017.
- Domingues R, Carvalho GC de, da Silva Oliveira, L M, Futata Taniguchi E, Zimbres JM, Aoki V, da Silva Duarte, A J, Sato MN (2015) *The dysfunctional innate immune response triggered by Toll-like receptor activation is restored by TLR7/TLR8 and TLR9 ligands in cutaneous lichen planus*. *Br J Dermatol* 172, S. 48–55. doi:10.1111/bjd.13214.
- Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD (2002) *IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking*. *J Immunol* 168, S. 3195–3204.

- Edwards PC, Kelsch R (2002) *Oral lichen planus: clinical presentation and management*. J Can Dent Assoc 68, S. 494–499.
- Eisen D (2002) *The clinical features, malignant potential, and systemic associations of oral lichen planus: a study of 723 patients*. J Am Acad Dermatol 46, S. 207–214.
- Elder DE (2015) *Lever's histopathology of the skin*. Wolters Kluwer Health, Philadelphia.
- Ellis FA (1967) *Histopathology of lichen planus based on analysis of one hundred biopsy specimens*. J Invest Dermatol 48, S. 143–148.
- Fania L, Caldarola G, Müller R, Brandt O, Pellicano R, Feliciani C, Hertl M (2012) *IgE recognition of bullous pemphigoid (BP)180 and BP230 in BP patients and elderly individuals with pruritic dermatoses*. Clin Immunol 143, S. 236–245.  
doi:10.1016/j.clim.2012.02.003.
- Farhi D, Dupin N (2010) *Pathophysiology, etiologic factors, and clinical management of oral lichen planus, part I: facts and controversies*. Clin Dermatol 28, S. 100–108.  
doi:10.1016/j.clindermatol.2009.03.004.
- Farthing PM, Cruchley AT (1989) *Expression of MHC class II antigens (HLA DR, DP and DQ) by keratinocytes in oral lichen planus*. J Oral Pathol Med 18, S. 305–309.
- Farthing PM, Matear P, Cruchley AT (1990) *The activation of Langerhans cells in oral lichen planus*. J Oral Pathol Med 19, S. 81–85.
- Fazel N (2015) *Cutaneous lichen planus: A systematic review of treatments*. J Dermatolog Treat 26, S. 280–283. doi:10.3109/09546634.2014.933167.
- Firth FA, Friedlander LT, Parachuru VPB, Kardos TB, Seymour GJ, Rich AM (2015) *Regulation of immune cells in oral lichen planus*. Arch Dermatol Res 307, S. 333–339.  
doi:10.1007/s00403-015-1540-8.
- Fox LP, Lightdale CJ, Grossman ME (2011) *Lichen planus of the esophagus: what dermatologists need to know*. J Am Acad Dermatol 65, S. 175–183.  
doi:10.1016/j.jaad.2010.03.029.
- Franzke C, Bruckner P, Bruckner-Tuderman L (2005) *Collagenous transmembrane proteins: recent insights into biology and pathology*. J Biol Chem 280, S. 4005–4008.  
doi:10.1074/jbc.R400034200.
- Fujii H, Ohashi M, Nagura H (1988) *Immunohistochemical analysis of oral lichen-planus-like eruption in graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation*. Am J Clin Pathol 89, S. 177–186.
- Gaber MA, Maraee AH, Alsheraky DR, Azeem MHA (2014) *Immunohistochemical expression of perforin in lichen planus lesions*. Ultrastruct Pathol 38, S. 413–419.  
doi:10.3109/01913123.2014.960541.
- Gadenne AS, Strucke R, Dunn D, Wagner M, Bleicher P, Bigby M (1994) *T-cell lines derived from lesional skin of lichen planus patients contain a distinctive population of T-cell receptor gamma delta-bearing cells*. J Invest Dermatol 103, S. 347–351.
- Gaertner E, Elstein W (2012) *Lichen planus pigmentosus-inversus: case report and review of an unusual entity*. Dermatol Online J 18, S. 11.

- Gholizadeh N, Khoini Poorfar H, TaghaviZenouz A, Vatandoost M, Mehdipour M (2015) *Comparison of Serum Autoantibodies to Desmogleins I, III in Patients with Oral Lichen Planus and Healthy Controls*. Iran J Pathol 10, S. 136–140.
- Glick M, Feagans WM (2015) *Burket's oral medicine*. People's Medical Publishing House, Shelton, Connecticut.
- Gorouhi F, Davari P, Fazel N (2014) *Cutaneous and mucosal lichen planus: a comprehensive review of clinical subtypes, risk factors, diagnosis, and prognosis*. ScientificWorldJournal 2014, S. 742826. doi:10.1155/2014/742826.
- Gupta S, Jawanda MK (2015) *Oral Lichen Planus: An Update on Etiology, Pathogenesis, Clinical Presentation, Diagnosis and Management*. Indian J Dermatol 60, S. 222–229. doi:10.4103/0019-5154.156315.
- Hashimoto T, Fukuda A, Himejima A, Morita S, Tsuruta D, Koga H, Krol RP, Ishii N (2015) *Ten cases of severe oral lichen planus showing granular C3 deposition in oral mucosal basement membrane zone*. Eur J Dermatol. doi:10.1684/ejd.2015.2655.
- Hernández-Molina G, Michel-Peregrina M, Hernández-Ramírez DF, Sánchez-Guerrero J, Llorente L (2011) *Chemokine saliva levels in patients with primary Sjögren's syndrome, associated Sjögren's syndrome, pre-clinical Sjögren's syndrome and systemic autoimmune diseases*. Rheumatology (Oxford) 50, S. 1288–1292. doi:10.1093/rheumatology/ker019.
- Herrero-González JE, Parera Amer E, Segura S, Mas Bosch V, Pujol RM, Martínez Escala ME (2015) *Epithelial antigenic specificities of circulating autoantibodies in mucosal lichen planus*. Int J Dermatol. doi:10.1111/ijd.12990.
- Holmstrup P, Schiøtz AW, Westergaard J (1990) *Effect of dental plaque control on gingival lichen planus*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 69, S. 585–590.
- Hu J, Zhang J, Cui J, Liang X, Lu R, Du G, Xu X, Zhou G (2013) *Increasing CCL5/CCR5 on CD4+ T cells in peripheral blood of oral lichen planus*. Cytokine 62, S. 141–145. doi:10.1016/j.cyto.2013.01.020.
- Huang Z (2005) *A review of progress in clinical photodynamic therapy*. Technol Cancer Res Treat 4, S. 283–293.
- Iijima W, Ohtani H, Nakayama T, Sugawara Y, Sato E, Nagura H, Yoshie O, Sasano T (2003) *Infiltrating CD8+ T cells in oral lichen planus predominantly express CCR5 and CXCR3 and carry respective chemokine ligands RANTES/CCL5 and IP-10/CXCL10 in their cytolytic granules: a potential self-recruiting mechanism*. Am J Pathol 163, S. 261–268. doi:10.1016/S0002-9440(10)63649-8.
- Ikeda N, Ishii T, Iida S, Kawai T (1991) *Epidemiological study of oral leukoplakia based on mass screening for oral mucosal diseases in a selected Japanese population*. Community Dent Oral Epidemiol 19, S. 160–163.
- Ingafou M, Leao JC, Porter SR, Scully C (2006) *Oral lichen planus: a retrospective study of 690 British patients*. Oral Dis 12, S. 463–468. doi:10.1111/j.1601-0825.2005.01221.x.
- Irvine C, Irvine F, Champion RH (1991) *Long-term follow-up of lichen planus*. Acta Derm Venereol 71, S. 242–244.

- Isailovic N, Daigo K, Mantovani A, Selmi C (2015) *Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation*. J Autoimmun 60, S. 1–11. doi:10.1016/j.jaut.2015.04.006.
- Ismail SB, Kumar SKS, Zain RB (2007) *Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation*. J Oral Sci 49, S. 89–106.
- James WD, Berger TG, Elston D (2006) *Andrews' Diseases of the skin*; Clinical dermatology. Saunders, Philadelphia, London.
- Joshi R (2013) *Interface dermatitis*. Indian J Dermatol Venereol Leprol 79, S. 349–359. doi:10.4103/0378-6323.110780.
- Jungell P, Konttinen YT, Malmström M (1989) *Basement membrane changes in oral lichen planus*. Proc Finn Dent Soc 85, S. 119–124.
- Kaur J, Jacobs R (2015) *Proinflammatory cytokine levels in oral lichen planus, oral leukoplakia, and oral submucous fibrosis*. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 41, S. 171–175. doi:10.5125/jkaoms.2015.41.4.171.
- Khan A, Farah CS, Savage NW, Walsh LJ, Harbrow DJ, Sugerman PB (2003) *Th1 cytokines in oral lichen planus*. J Oral Pathol Med 32, S. 77–83.
- Lodi G, Scully C, Carrozzo M, Griffiths M, Sugerman PB, Thongprasom K (2005a) *Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 1. Viral infections and etiopathogenesis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 100, S. 40–51. doi:10.1016/j.tripleo.2004.06.077.
- Lodi G, Scully C, Carrozzo M, Griffiths M, Sugerman PB, Thongprasom K (2005b) *Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 2. Clinical management and malignant transformation*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 100, S. 164–178. doi:10.1016/j.tripleo.2004.06.076.
- Löffler G, Heinrich PC, Petrides PE (Hrsg) (2007) *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Medizin Verlag Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Lu R, Zhou G, Du G, Xu X, Yang J, Hu J (2011) *Expression of T-bet and GATA-3 in peripheral blood mononuclear cells of patients with oral lichen planus*. Arch Oral Biol 56, S. 499–505. doi:10.1016/j.archoralbio.2010.11.006.
- Lukac J, Brozović S, Vucicević-Boras V, Mravak-Stipetić M, Malenica B, Kusić Z (2006) *Serum autoantibodies to desmogleins 1 and 3 in patients with oral lichen planus*. Croat Med J 47, S. 53–58.
- Lüllmann-Rauch R (2009) *Taschenlehrbuch Histologie*; 10 Tabellen. Thieme, Stuttgart.
- Mattila R, Ahlfors E, Syrjänen S (2011) *CD27 and CD38 lymphocytes are detected in oral lichen planus lesions*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 111, S. 211–217. doi:10.1016/j.tripleo.2010.09.075.
- McCreary CE, McCartan BE (1999) *Clinical management of oral lichen planus*. Br J Oral Maxillofac Surg 37, S. 338–343. doi:10.1054/bjom.1999.0131.
- Miossec P, Kolls JK (2012) *Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation*. Nat Rev Drug Discov 11, S. 763–776. doi:10.1038/nrd3794.



- Miyara M, Sakaguchi S (2011) *Human FoxP3(+)/CD4(+) regulatory T cells: their knowns and unknowns*. Immunol Cell Biol 89, S. 346–351. doi:10.1038/icb.2010.137.
- Möbs C, Slotosch C, Löffler H, Jakob T, Hertl M, Pfützner W (2010) *Birch pollen immunotherapy leads to differential induction of regulatory T cells and delayed helper T cell immune deviation*. J Immunol 184, S. 2194–2203. doi:10.4049/jimmunol.0901379.
- Mostafa D, Tarakji B (2015) *Photodynamic therapy in treatment of oral lichen planus*. J Clin Med Res 7, S. 393–399. doi:10.14740/jocmr2147w.
- Murphy KM, Travers P, Walport M, Janeway CA, Ehrenstein M, Seidler L (2014) *Janeway Immunologie*. Springer Spektrum, Berlin.
- Murti PR, Daftary DK, Bhonsle RB, Gupta PC, Mehta FS, Pindborg JJ (1986) *Malignant potential of oral lichen planus: observations in 722 patients from India*. J Oral Pathol 15, S. 71–77.
- Nelke KH, Pawlak W, Leszczyszyn J, Gerber H (2014) *Photodynamic therapy in head and neck cancer*. Postepy Hig Med Dosw (Online) 68, S. 119–128. doi:10.5604/17322693.1088044.
- Nico MMS, Fernandes JD, Lourenço SV (2011) *Oral lichen planus*. An Bras Dermatol 86, S. 633–41; quiz 642–3.
- Nogueira PA, Carneiro S, Ramos-e-Silva M (2015) *Oral lichen planus: an update on its pathogenesis*. Int J Dermatol 54, S. 1005–1010. doi:10.1111/ijd.12918.
- Pekiner FN, Demirel GY, Borahan MO, Ozbayrak S (2012) *Cytokine profiles in serum of patients with oral lichen planus*. Cytokine 60, S. 701–706. doi:10.1016/j.cyto.2012.08.007.
- Pfütze M, Niedermeier A, Hertl M, Eming R (2007) *Introducing a novel Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score (ABSIS) in pemphigus*. Eur J Dermatol 17, S. 4–11. doi:10.1684/ejd.2007.0090.
- Powell AM, Sakuma-Oyama Y, Oyama N, Black MM (2005) *Collagen XVII/BP180: a collagenous transmembrane protein and component of the dermoepidermal anchoring complex*. Clin Exp Dermatol 30, S. 682–687. doi:10.1111/j.1365-2230.2005.01937.x.
- Ragaz A, Ackerman AB (1981) *Evolution, maturation, and regression of lesions of lichen planus. New observations and correlations of clinical and histologic findings*. Am J Dermatopathol 3, S. 5–25.
- Ramón-Fluixá C, Bagán-Sebastián J, Milián-Masanet M, Scully C (1999) *Periodontal status in patients with oral lichen planus: a study of 90 cases*. Oral Dis 5, S. 303–306.
- Reich HL, Nguyen JT, James WD (2004) *Annular lichen planus: a case series of 20 patients*. J Am Acad Dermatol 50, S. 595–599. doi:10.1016/j.jaad.2003.08.011.
- Roopashree MR, Gondhalekar RV, Shashikanth MC, George J, Thippeswamy SH, Shukla A (2010) *Pathogenesis of oral lichen planus--a review*. J Oral Pathol Med 39, S. 729–734. doi:10.1111/j.1600-0714.2010.00946.x.
- Rozas Muñoz E, Martínez-Escala ME, Juanpere N, Armentia J, Pujol RM, Herrero-González JE (2011) *Isolated conjunctival lichen planus: a diagnostic challenge*. Arch Dermatol 147, S. 465–467. doi:10.1001/archdermatol.2011.68.

- Sadaksharam J, Nayaki KPT, Selvam NP (2012) *Treatment of oral lichen planus with methylene blue mediated photodynamic therapy--a clinical study*. Photodermatol Photoimmunol Photomed 28, S. 97–101. doi:10.1111/j.1600-0781.2012.00647.x.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA (2004) *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol 75, S. 163–189. doi:10.1189/jlb.0603252.
- Shaker O, Hassan AS (2012) *Possible role of interleukin-17 in the pathogenesis of lichen planus*. Br J Dermatol 166, S. 1367–1368. doi:10.1111/j.1365-2133.2011.10793.x.
- Shen Z, Gao X, Ma L, Zhou Z, Shen X, Liu W (2014) *Expression of Foxp3 and interleukin-17 in lichen planus lesions with emphasis on difference in oral and cutaneous variants*. Arch Dermatol Res 306, S. 441–446. doi:10.1007/s00403-013-1429-3.
- Shevach EM (2000) *Regulatory T cells in autoimmunity\**. Annu Rev Immunol 18, S. 423–449. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.423.
- Skaria M, Salomon D, Jaunin F, Friedli A, Saurat JH, Borradori L (1999) *IgG autoantibodies from a lichen planus pemphigoides patient recognize the NC16A domain of the bullous pemphigoid antigen 180*. Dermatology 199, S. 253–255.
- Sobaniec S, Bernaczyk P, Pietruski J, Cholewa M, Skurska A, Dolińska E, Duraj E, Tokajuk G, Paniczko A, Olszewska E, Pietruska M (2013) *Clinical assessment of the efficacy of photodynamic therapy in the treatment of oral lichen planus*. Lasers Med Sci 28, S. 311–316. doi:10.1007/s10103-012-1153-9.
- Spandau U, Toksoy A, Goebeler M, Bröcker EB, Gillitzer R (1998) *MIG is a dominant lymphocyte-attractant chemokine in lichen planus lesions*. J Invest Dermatol 111, S. 1003–1009. doi:10.1046/j.1523-1747.1998.00426.x.
- Sugerman PB, Satterwhite K, Bigby M (2000) *Autocytotoxic T-cell clones in lichen planus*. Br J Dermatol 142, S. 449–456.
- Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Zhao ZZ, Zhou XJ, Khan A, Seymour GJ, Bigby M (2002) *The pathogenesis of oral lichen planus*. Crit Rev Oral Biol Med 13, S. 350–365.
- Sugerman PB, Savage NW, Xu LJ, Walsh LJ, Seymour GJ (1995) *Heat shock protein expression in oral lichen planus*. J Oral Pathol Med 24, S. 1–8.
- Sun A, Wang JT, Chia JS, Chiang CP (2005) *Serum interleukin-8 level is a more sensitive marker than serum interleukin-6 level in monitoring the disease activity of oral lichen planus*. Br J Dermatol 152, S. 1187–1192. doi:10.1111/j.1365-2133.2005.06497.x.
- Takahashi H, Kouno M, Nagao K, Wada N, Hata T, Nishimoto S, Iwakura Y, Yoshimura A, Yamada T, Kuwana M, Fujii H, Koyasu S, Amagai M (2011) *Desmoglein 3-specific CD4+ T cells induce pemphigus vulgaris and interface dermatitis in mice*. J Clin Invest 121, S. 3677–3688. doi:10.1172/JCI57379.
- Takatsu K (2011) *Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases*. Proc Jpn Acad , Ser B, Phys Biol Sci 87, S. 463–485.

- Taylor A, Verhagen J, Blaser K, Akdis M, Akdis CA (2006) *Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells*. Immunology 117, S. 433–442. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02321.x.
- Terlou A, Santegoets LAM, van der Meijden, Willem I, Heijmans-Antonissen C, Swagemakers SMA, van der Spek, Peter J, Ewing PC, van Beurden M, Helmerhorst TJM, Blok LJ (2012) *An autoimmune phenotype in vulvar lichen sclerosus and lichen planus: a Th1 response and high levels of microRNA-155*. J Invest Dermatol 132, S. 658–666. doi:10.1038/jid.2011.369.
- Thoma-Uszynski S, Uter W, Schwietzke S, Hofmann SC, Hunziker T, Bernard P, Treudler R, Zouboulis CC, Schuler G, Borradori L, Hertl M (2004) *BP230- and BP180-specific auto-antibodies in bullous pemphigoid*. J Invest Dermatol 122, S. 1413–1422. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.22603.x.
- Thorn JJ, Holmstrup P, Rindum J, Pindborg JJ (1988) *Course of various clinical forms of oral lichen planus. A prospective follow-up study of 611 patients*. J Oral Pathol 17, S. 213–218.
- Usatine RP, Tinitigan M (2011) *Diagnosis and treatment of lichen planus*. Am Fam Physician 84, S. 53–60.
- Verschoor CP, Lelic A, Bramson JL, Bowdish DME (2015) *An Introduction to Automated Flow Cytometry Gating Tools and Their Implementation*. Front Immunol 6, S. 380. doi:10.3389/fimmu.2015.00380.
- Vincent SD, Fotos PG, Baker KA, Williams TP (1990) *Oral lichen planus: the clinical, historical, and therapeutic features of 100 cases*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 70, S. 165–171.
- Wagner G, Rose C, Sachse MM (2013) *Clinical variants of lichen planus*. J Dtsch Dermatol Ges 11, S. 309–319. doi:10.1111/ddg.12031.
- Walton LJ, Macey MG, Thornhill MH, Farthing PM (1998) *Intra-epithelial subpopulations of T lymphocytes and Langerhans cells in oral lichen planus*. J Oral Pathol Med 27, S. 116–123.
- Wang K, Miao T, Lu W, He J, Cui B, Li J, Li Y, Xiao L (2015a) *Analysis of oral microbial community and Th17-associated cytokines in saliva of patients with oral lichen planus*. Microbiol Immunol 59, S. 105–113. doi:10.1111/1348-0421.12232.
- Wang Y, Zhou J, Fu S, Wang C, Zhou B (2015b) *A Study of Association Between Oral Lichen Planus and Immune Balance of Th1/Th2 Cells*. Inflammation 38, S. 1874–1879. doi:10.1007/s10753-015-0167-4.
- Waschke J, Spindler V (2014) *Desmosomes and extradesmosomal adhesive signaling contacts in pemphigus*. Med Res Rev 34, S. 1127–1145. doi:10.1002/med.21310.
- Wenzel J, Scheler M, Proelss J, Bieber T, Tüting T (2006) *Type I interferon-associated cytotoxic inflammation in lichen planus*. J Cutan Pathol 33, S. 672–678. doi:10.1111/j.1600-0560.2006.00527.x.
- Willsteed E, Bhogal BS, Das AK, Wojnarowska F, Black MM, McKee PH (1991) *Lichen planus pemphigoides: a clinicopathological study of nine cases*. Histopathology 19, S. 147–154.

- Xie S, Ding L, Xiong Z, Zhu S (2012) *Implications of Th1 and Th17 cells in pathogenesis of oral lichen planus*. J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci 32, S. 451–457. doi:10.1007/s11596-012-0078-7.
- Yoshie O, Imai T, Nomiyama H (2001) *Chemokines in immunity*. Adv Immunol 78, S. 57–110.
- Zain RB, Ikeda N, Razak IA, Axéll T, Majid ZA, Gupta PC, Yaacob M (1997) *A national epidemiological survey of oral mucosal lesions in Malaysia*. Community Dent Oral Epidemiol 25, S. 377–383.
- Zhang R, Zhu W (2011) *Lichen planus pigmentosus over superficial leg veins*. J Dtsch Dermatol Ges 9, S. 540–541. doi:10.1111/j.1610-0387.2011.07610.x.
- Zhao ZZ, Savage NW, Pujic Z, Walsh LJ (1997) *Immunohistochemical localization of mast cells and mast cell-nerve interactions in oral lichen planus*. Oral Dis 3, S. 71–76.
- Zhao ZZ, Sugerman PB, Walsh LJ, Savage NW (2002) *Expression of RANTES and CCR1 in oral lichen planus and association with mast cell migration*. J Oral Pathol Med 31, S. 158–162.
- Zhao ZZ, Sugerman PB, Zhou XJ, Walsh LJ, Savage NW (2001) *Mast cell degranulation and the role of T cell RANTES in oral lichen planus*. Oral Dis 7, S. 246–251.
- Zheng Y, Rudensky AY (2007) *Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage*. Nat Immunol 8, S. 457–462. doi:10.1038/ni1455.
- Zhou XJ, Savage NW, Sugerman PB, Walsh LJ, Aldred MJ, Seymour GJ (1996) *TCR V beta gene expression in lesional T lymphocyte cell lines in oral lichen planus*. Oral Dis 2, S. 295–298.
- Zhu J, Yamane H, Paul WE (2010) *Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*)*. Annu Rev Immunol 28, S. 445–489. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101212.
- Zillikens D (2002) *BP180 as the common autoantigen in blistering diseases with different clinical phenotypes*. Keio J Med 51, S. 21–28.
- Zillikens D, Caux F, Mascaro JM, Wesselmann U, Schmidt E, Prost C, Callen JP, Bröcker EB, Diaz LA, Giudice GJ (1999) *Autoantibodies in lichen planus pemphigoides react with a novel epitope within the C-terminal NC16A domain of BP180*. J Invest Dermatol 113, S. 117–121. doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00618.x.

## **7 VERZEICHNIS AKADEMISCHER LEHRER**

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren, Doktoren und Dozenten

In Freiburg:

Aktories, Altenburger, Aschendorff, Att, Bannwarth, Behrends, Bentrop, Bernhart, Boch, Bödeker, Böhm, Bronsert, Bross, Cepa, Ermer, Fakler, Feierabend, Fischer, Frei, Frotscher, Grauvogel, Grotz, Güss, Gutwald, Hassepaß, Haverkamp, Heck, Heimrich, Hein, Heinz, Hellwig, Helm, Hildenbrand, Hofmann, Idzko, Illerhaus, Jakob, Jung, Just, Kassem, Kayser, Kirsch, Klugbauer, Kohal, Krieger, Krieglstein, Leemhuism, Löffler, Löhle, Maier, May, Meiß, Metzger, Mockenhaupt, Müller, Müller-Hermann, Nagursky, Nshan, Offergeld, Orth, Otten, Panning, Pfanner, Pfeiffer, Pfister-Wartha, Polydorou, Proksch, Raffauf, Rasenack, Rathka-Krüger, Roussa, Ruf, Sauerbier, Scaal, Scheifele, Schempp, Schirrmeister, Schmelzeisen, Schmidt, Schneider, Schulze, Schwenk, Sitaru, Spraul, Staiger, Strobel, Strub, Szabo, Technau, Tennert, Timme-Bronsert, Tropschug, Voss, Weirich, Werner, Wiedemann, Wink, Wölber, Wrbas.

## 8 DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. M. Hertl für die freundliche Überlassung des Promotions-themas, für die Bereitstellung aller benötigten Materialien und für die persönliche Betreuung danken.

Frau Prof. Dr. N. Arweiler, Frau Dr. R. Cosgarea und der Abteilung für Parodontologie der Philipps-Universität Marburg gilt mein Dank für die freundliche Zusammenarbeit bei der Durchführung des Projektteils „Gruppe-Oraler Lichen Planus“.

Mein ganz besonderer Dank geht an meinen Betreuer Herrn Dr. T. Schmidt, der sich mit viel Enthusiasmus meiner Einführung in die laboranalytische Diagnostik widmete und jederzeit Antwort auf meine Fragen fand. Ohne seine Einsatzbereitschaft, seine Geduld und seine stets motivierende Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Besonders danke ich ihm jedoch für die große Portion Menschlichkeit, die er neben aller Forschungsarbeit immer wieder bewies.

Dem gesamten Laborteam inklusive Stella und allen Mitarbeitern der Klinik für Dermatologie und Allergologie der Philipps-Universität Marburg gilt mein Dank für die tatkräftige freundliche Unterstützung bei der Realisierung der vorliegenden Arbeit und für die nette Zusammenarbeit. Auch Frau S. Marburger danke ich für ihre Hilfe bei allen organisatorischen Fragen.

Zudem möchte ich mich bei allen Patienten, Mitarbeitern und Doktoranden für die Teilnahme an der Studie und für die Bereitstellung des Probenmaterials bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Freund Matthäus bedanken, der sich freundlicher Weise nicht nur einer akribischen Korrekturlesung dieser Arbeit gewidmet hat, sondern auch seit vielen Jahren in allen Lebenslagen treu an meiner Seite steht. Ein ebenso herzlicher Dank geht an Evelyn für ihre fleißige Unterstützung.

Meinen wundervollen Marburger Freunden danke ich für das fabelhafte gemeinsame Doktorarbeitsjahr und die vielen kleinen schönen Momente, an die ich mich noch lange erinnern werde.

Nicht zuletzt danke ich natürlich meiner lieben Familie, die mich seit jeher so fabelhaft und bedingungslos unterstützt und hoffe, ihnen mit dieser Arbeit eine kleine Freude machen zu können. Letztendlich ist dieses Werk euer Verdienst.

Ort, Datum, Unterschrift Betreuer